

**Frequenzanalyse einer Punktmutation im Exon A
des CD45 Gens und lymphozytäre
CD45RC Expressionsmuster bei Patienten mit
Morbus Crohn und Colitis ulcerosa im Vergleich
zu einem Kontrollkollektiv**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Med. Kathrin Rebstock
geboren am 11. Juni 1965 in Erfurt

23. März 2006

1. Gutachter: *Prof. Dr. med. Barz, Jena*

2. Gutachter: *Prof. Dr. med. Wolf, Jena*

3. Gutachter: *Prof. Dr. med. Lehmann, Rostock*

Tag der öffentlichen Verteidigung: *26. September 2006*

Verzeichnis der Abkürzungen

ALAT	Alanin-Aminotransferase
ANA	Antinukleäre Antikörper
ANCA	Antineutrophile Cytoplasmatische Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
Aqua dest.	Aqua destillata
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ASCA	Antikörper gegen Oligomannosid-Epitope von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5-ASA	5 amino salicylic acid
bp	Basenpaare
CARD15	c-Terminal Caspase Recruitment Domain 15
C. ulcerosa	Colitis ulcerosa
CD	Cluster of differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
DCCV	Deutsche Morbus Crohn/Colitis ulcerosa Vereinigung
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- u. Stoffwechselerkrankungen
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Forward light Scatter
γ -GT	Gammaglutamyltransferase
HLA	Human Leucocyte Antigen system
ICAM-1	Intercellular Adhesion Moleküle-1
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IFN- γ	Interferon-Gamma
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin

KG	Körpergewicht
Lj.	Lebensjahr
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Major Histocompatibility Complex
M. Crohn	Morbus Crohn
MRT	Magnetresonanztomographie
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
<i>Msp I</i>	<i>Moraxella speziei I</i>
NGFN	Nationales Genforschungsnetz
NKFB	Nuclear faktor-kappaB
NOD2	Nucleotid Oligodimerisation Domain 2
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin-Farbstoff
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
SCID	Severe combined immunodeficiency
SLE	systemic lupus erythematosus
SSC	Side Scatter
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor- α
TGF	Transforming Growth Factor
vs.	versus

1 Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	3
1 Inhaltsverzeichnis	5
2 Zusammenfassung	7
3 Einleitung	9
3.1 Krankheitsbilder und Diagnostik von M. Crohn und C. ulcerosa	10
3.2 Immunologische Prozesse bei M. Crohn und C. ulcerosa	16
3.3 Biologie des CD45	18
4 Ziele der Arbeit	25
5 Material und Methoden	26
5.1 Ausstattung	26
5.1.1 Geräte und Hersteller	26
5.1.2 Chemikalien und Reagenzien	26
5.1.3 Verbrauchslösungen	27
5.1.4 Einmalartikel	28
5.1.5 Antikörper	28
5.1.6 Primer für PCR- und PCR-RFLP-Reaktionen	30
5.1.7 Enzym für die RFLP-Analyse	31
5.1.8 Patienten und Kontrollpersonen	31
5.2 Die Durchflusszytometrie	32
5.2.1 Funktion des Durchflusszytometers	32
5.2.2 Färbeansätze für durchflusszytometrische Messungen	34
5.3 DNA-Analysen	37
5.3.1 Präparation der DNA	37
5.3.2 Quantifizierung der DNA	38
5.3.3 PCR-Reaktion	39
5.3.4 Herstellung von Agarosegelen für den Nachweis der PCR-Produkte	40
5.3.5 Herstellung von Agarosegelen für die Auftrennung von PCR-RFLP Produkten	41
5.3.6 Elektrophorese der PCR-Produkte	41
5.3.7 Fotografieren von Gelen	42
5.3.8 RFLP (Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen) Analyse	42
5.4 Statistik	44
6 Ergebnisse	45

6.1	Durchflusszytometrische Analyse	45
6.1.1	Durchflusszytometrische Darstellung der Leukozytenpopulationen	45
6.1.2	Ergebnisse der Titration der CD45 Antikörper	46
6.1.3	Isotypkontrollen für die ausgewählten CD45 Antikörper	50
6.1.4	Durchflusszytometrische Analysen	52
6.2	Molekulargenetische Ergebnisse	59
6.2.1	Nachweis des PCR-Produktes für Exon A des CD45 Gens	59
6.2.2	Nachweis der Punktmutation in der RFLP-Analyse	60
6.2.3	Vergleiche der Allelfrequenzen	63
7	Diskussion	65
8	Schlussfolgerungen	76
9	Literatur- und Quellenverzeichnis	78
10	Anhang	88
10.1	Votum der Ethikkommission	88
10.2	Danksagung	89
10.3	Lebenslauf	90
10.4	Ehrenwörtliche Erklärung	91

2 Zusammenfassung

Verschiedene Isoformen des auf sämtlichen Leukozyten vorkommenden CD45 Moleküls werden durch alternatives Spleißen der Exons A, B und C erzeugt. Das exprimierte Isoformmuster markiert den Differenzierungszustand von T-Zellen. Nicht aktivierte T-Zellen exprimieren die Isoformen ABC, AB, BC und B, während nach der Aktivierung nur die Isoformen B und 0 auftreten.

Außer diesem klassischen CD45 Expressionsmuster wurde ein variantes Expressionsmuster beschrieben, wo alle T-Zellen trotz Aktivierung weiterhin die Isoform AB exprimieren. Dieser regulatorische Polymorphismus beruht auf einer Punktmutation (C zu G) an Position 77 im Exon A des CD45 Gens.

Diese Punktmutation ist mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert.

Die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn (M. Crohn) und Colitis ulcerosa (C. ulcerosa) wird durch genetische, immunologische, autoimmunologische und Umweltfaktoren beeinflusst.

Deshalb war Ziel dieser Arbeit, festzustellen, ob die Punktmutation im Exon A des CD45 Gens mit entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert ist und es sollte analysiert werden, ob bei entzündlichen Darmerkrankungen variante CD45 Expressionsmuster auftreten.

Dafür wurde das CD45 Expressionsmuster der Lymphozyten von 200 gesunden Blutspendern (Kontrollgruppe), 111 Patienten mit M. Crohn und 72 Patienten mit C. ulcerosa im Durchflusszytometer mit einem CD45RA markierten Antikörper, einem CD45R0 markierten Antikörper und einem CD45RC markierten Antikörper analysiert. Zusätzlich wurde von allen Studienteilnehmern die DNA isoliert, Exon A des CD45 Gens amplifiziert und nachfolgend dieses Amplifikat mit dem Restriktionsenzym *Msp I* (PCR-RFLP) verdaut, um die Punktmutation im Exon A zu detektieren.

Die phänotypischen Analysen mit dem CD45RC markiertem Antikörper zeigten bei allen Studienteilnehmern identische CD45RC Expressionsmuster.

Variante CD45RC Expressionsmuster traten nicht auf.

Das variante CD45RA Expressionsmuster wurde in der Kontrollgruppe sechsmal (3,0 %), bei Patienten mit M. Crohn einmal (0,9 %) und bei Patienten mit C. ulcerosa fünfmal (6,9 %) nachgewiesen. Bei allen gefundenen varianten CD45 Expressions-

mustern lagen die Punktmutationen in heterozygoter Form vor, ein homozygoter Träger wurde nicht gefunden.

Alle Studienteilnehmer mit dem klassischen CD45 Expressionsmuster waren negativ für den Nachweis der Punktmutation.

Die Punktmutation hatte eine Frequenz von 1,5 % im Kontrollkollektiv, 0,45 % bei Patienten mit M. Crohn und 3,48 % bei Patienten mit C. ulcerosa.

Die unterschiedliche Frequenz des Auftretens der Punktmutation bei Patienten mit M. Crohn im Vergleich zu Patienten mit C. ulcerosa ist statistisch signifikant ($p = 0,036$).

Es wird diskutiert, dass autoimmunologische Mechanismen für die Pathogenese der Erkrankung C. ulcerosa von Bedeutung sind. Die hier erzielten Ergebnisse unterstützen diese Hypothese, da die Punktmutation mit verschiedenen anderen Autoimmunerkrankungen assoziiert ist.

Weiterhin deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Punktmutation stärker prädisponierend für C. ulcerosa wirkt als für M. Crohn.

Zusätzlich könnten aus den vorliegenden Ergebnissen auch Konsequenzen für die Diagnosesicherung der beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen resultieren. In einigen Fällen dieser Erkrankungen (ca. 10 %) gelingt die endgültige Diagnosestellung bis heute nicht zufrieden stellend. Da die Punktmutation in unterschiedlicher Frequenz bei M. Crohn und C. ulcerosa auftritt, könnte sie als Parameter genutzt werden, um die Differentialdiagnose zu verbessern.

3 Einleitung

In den letzten Jahren sind neue Erkenntnisse zur Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gesammelt worden. Trotz intensiver Forschungen sind viele Aspekte der Pathogenese, insbesondere der Einfluss von autoimmunologischen Komponenten, nur unvollständig bekannt (Podolsky 1991, Stein und Dignass 2001). C. ulcerosa und M. Crohn sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen mit ineinander greifenden klinischen, epidemiologischen und pathologischen Befunden. Die Zahl der Patienten in Deutschland wird von der Deutschen Morbus Crohn/Colitis ulcerosa Vereinigung (DCCV) auf über 320.000 angegeben. In den vergangenen Jahrzehnten zeigt sich ein Anstieg der Neuerkrankungen, der derzeit bei M. Crohn 1,3–15,1 pro 10.000 Einwohner und bei C. ulcerosa 0,5–6,3 pro 10.000 Einwohner beträgt. Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr. In den letzten Jahren haben die Neuerkrankungen besonders bei Kindern und Jugendlichen zugenommen. Damit verbunden ist u. a. eine erhebliche Verzögerung im Wachstum und Einsetzen der Pubertätsreife, was wiederum zu weiterführenden Komplikationen führen kann. Langzeitfolge einer CED ist eine deutlich erhöhte Inzidenz in der Entwicklung des kolorektalen Adenokarzinoms (Schmiegel et al. 2000).

Liegt der Beginn der Erkrankungssymptome im Mittel um das 30. Lebensjahr, bedeutet das für die Patienten, während ihrer gesamten beruflichen Laufbahn von der Erkrankung betroffen zu sein. Patienten mit chronischer Aktivität der Erkrankung haben ca. viermal pro Jahr Kontakt zum behandelnden Hausarzt und bei ca. 35 % der Patienten werden zusätzliche diagnostische Untersuchungen von anderen Fachärzten durchgeführt. Die ermittelten medizinischen Kosten für Medikamente liegen nach heutigen Einschätzungen bei ca. 613,40 Euro pro Patient/Jahr. Die ökonomische Bewertung des Erkrankungskreises gewinnt zunehmend an Bedeutung (Beiche 2003). Somit ist es gesundheitspolitisch wichtig, durch prophylaktische Untersuchungen eventuell gefährdete Personen so früh wie möglich zu erfassen, zu beraten und zu behandeln. Dabei sollten die Screening-Methoden nichtinvasiv, einfach zu handhaben und kostengünstig sein. Die Methoden der Blutanalysen erfahren dabei im Allgemeinen bei den Erkrankten große Akzeptanz, zeigen aber häufig eine unbefriedigende Signifikanz oder Spezifität.

3.1 Krankheitsbilder und Diagnostik von M. Crohn und C. ulcerosa

Es gibt Hinweise, dass eine Mischung aus umweltbedingten, immunologischen und genetischen Faktoren eine Rolle für die Ätiologie und Pathogenese der Erkrankungen spielen (Dignass und Goebell 1998, Podolsky 2002, Lehmann 2003). Bei den umweltbedingten Faktoren stehen u. a. Rauchen, Ernährung, Hygiene, Klima, psychosoziale Faktoren und Stress im Mittelpunkt. Infektiöse Ursachen durch Viren oder Bakterien wurden diskutiert (Cope et al. 1986, Herbert et al. 1993, Fiocchi 1998, Levenstein et al. 2000). Eine pathologische Interaktion zwischen luminalen Toxinen und Antigenen und dem intestinalen Immunsystem scheint ein weiterer wichtiger Faktor bei CED zu sein (Folwaczny et al. 2003). Das häufige Auftreten von Autoantikörpern (ANCA bei 67 % der Patienten mit C. ulcerosa, 7 % der Patienten mit M. Crohn) unterstützt die Hypothese der Autoimmunpathogenese (Seibold et al. 1996, 2000). Für die genetischen Prädisposition sprechen vor allem die familiäre Häufung, das Auftreten von CED in bestimmten Populationen (Karbon et al. 2004, Arnott et al. 2004) und Ergebnisse von Zwillingsstudien (Bayless et al. 1996, Yang and Rotter 2000). Nach neuen genetischen Untersuchungen scheint ein Suszeptibilitäts-gen (CARD15/NOD2) für die Entstehung von M. Crohn mitverantwortlich zu sein. Ein zweites Gen (DLG5), lokalisiert auf Chromosom 10, wurde als essentiell bei der Entstehung der CED beschrieben (Stoll et al. 2004). Ebenso wurden Studien bei Patienten mit M. Crohn und C. ulcerosa mit Veränderungen im Chromosom 1, 3 und 4 (Cho et al. 1998, Hampe et al. 1999), Chromosom 7 (Satsangi et al. 1996b), Chromosom 12 (Duerr 2003) und CD14 Gen (Klein et al. 2002, 2003) veröffentlicht. Bei beiden Erkrankungen handelt es sich um in Schüben verlaufende CED. Die chronische Entzündung des Darmgewebes entwickelt sich im Allgemeinen langsam, bleibt aber dann meist ein Leben lang bestehen. Die Patienten durchlaufen Phasen mit akuten, oft schweren Krankheitsschüben, die sich mit unterschiedlich langen Phasen mit nur geringen oder gar keinen Beschwerden (Remission) abwechseln. Leitsymptom der CED ist der Durchfall. Während er bei C. ulcerosa blutig-schleimig ist, wird bei M. Crohn häufig kein Blut im Stuhl gefunden. Weitere Symptome sind Fieber, Abdominalschmerz, allgemeine Ermüdbarkeit und Gewichtsverlust (Podolsky 1991, Fiocchi 1998). Neben vielen symptomatischen Gemeinsamkeiten zwischen M. Crohn und C. ulcerosa gibt es eindeutige spezifische Merkmale der jeweiligen Erkrankung. Diese wurden in Tabelle 1 einander gegenübergestellt.

Tab 1: Gemeinsamkeiten und Unterschiede von M. Crohn und C. ulcerosa

Merkmale	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
Ursachen	Multifaktoriell *erbliche Veranlagung *Störung des Immunsystems *Ernährungsgewohnheiten *sanitäre Gegebenheiten *psychosomatische Störungen *Infektionen	
Lokalisation	Ösophagus bis Anus möglich	Rektum, weiter aufsteigend im Kolon
Häufigkeit	2- 4 Neuerkr. pro 100.000 Ew/Jahr	2-10 Neuerkr. pro 100.00 Ew/Jahr
Geschlechtsverteilung	Gleiche Verteilungsmuster	Frauen häufiger als Männer
Alter	jedes Alter, Häufung 20.-30.Lj. und >60. Lj	Häufung 20.- 40. Lj.
Familiäre Häufung	deutlich: +++	möglich: +
Klinische Symptome	Flüssige bis wässrige Stuhlabgänge krampfartige Schmerzen Gewichtsverlust Appetitlosigkeit, Fieberschübe, Müdigkeit, Leukozytose	Durchfall mit Blut und Schleimhautbeimengungen Leibschmerzen (ganzes Abdomen, Kreuzbeinregion) chronische Müdigkeit, Fieber, Leukozytose, Anämie
Patholog.-anatom. und morphologische Veränderungen	diskontinuierliches Befallsmuster transmurale Ausdehnung des Entzündungsprozesses selten irreguläre Drüsenarchitektur Aphten, Ulcera (Erosionen) (Kryptenabszesse) häufig Fissuren und Fisteln	kontinuierliches Befallsmuster mucosale Ausdehnung des Entzündungsprozesses irreguläre Drüsenarchitektur typisch Erosionen, Ulcera Kryptenabszesse (Fissuren oder Fisteln)
Labordiagnostik	unspezifische Parameter „Spezifischer Parameter“: ANCA (P= 7%) Stuhluntersuchungen	unspezifische Parameter Spezifische Parameter: ANA (P=26%) ANCA (P=67%)
Endoskopischer Befund	Entzündungsmuster diskontinuierlich, asymmetrisch, typische aphtöse Läsionen, lokale Ulcera (longitudinal, fissurartig) Pflastersteinrelief Strikturen	Entzündungsmuster kontinuierlich, symmetrisch, immer mit Rektumbeteiligung typisches Erythem und Ödem, hochgradige Verletzlichkeit, oft Blutung, Schleim- und Eiterbildung, Pseudopolypen
Komplikationen	Fisteln (30-50% der Patienten) Abszessbildung (20% der Patienten) Darmverschluss (Ileus) Perforation Blutungskomplikationen	Toxisches Megakolon, Perforation schwere Blutungen Narbenbildung (Strikturen) seltener Fisteln oder Abszesse Krebsrisiko steigt mit Dauer
Therapie	konservativ, Diät, Kortikosteroide Antidiarrhoika, Antiphlogistika Sulfasalazin, Mesalazin, Metronidazol Immunsuppressiva (Azathioprin, Methotrexat)	Kortikosteroide, Diät, entzündungshemmende Mittel Sulfasalazin, Mesalazin Immunsuppressiva (Azathioprin, Cyclosporin)
Alternative Methoden oder Heilversuche	Operation, Biologische Therapeutika, Apheresetechniken Weihrauchtherapie, Wurmeiertherapie u.a.	

Nach der Darstellung der Gemeinsamkeiten und Unterschiede von M. Crohn und C. ulcerosa in Tabelle 1 werden im folgenden Abschnitt in Kurzfassung symptomatische Merkmale, gegenwärtig aktuelle diagnostische Verfahren und therapeutische Möglichkeiten für die beiden ausgewählten Erkrankungen ergänzt.

Der **M. Crohn** zeigt sich neben den in Tabelle 1 genannten Symptomen oft mit extraintestinalen Erscheinungen (bei ca. 40 % der Erkrankten), welche zu akuten immunologischen Begleiterkrankungen gehören können (periphere Arthritis, Iritis und Iridozyklitis, aphtöse Stomatitis und Erythema nodosum). Daneben werden assoziierte Erkrankungen gefunden, die jedoch einen unabhängigen Verlauf nehmen (ankylosierende Spondylitis, Sakroileitis und Uveitis). Komplikationen, die direkt die gestörte Physiologie des Darms betreffen, kommen vor (Stange et al. 2003).

Die Diagnose umfasst Laboruntersuchungen, Darmspiegelung, Röntgenuntersuchung und Ultraschall Diagnostik. Die allgemeinen Laboruntersuchungen geben wichtige Aufschlüsse über die Beteiligung des Gesamtorganismus, sind allerdings überwiegend unspezifisch (erniedrigtes Hämoglobin, erniedrigte Eisenwerte, Ferritin als Akutphaseprotein häufig erhöht, erhöhte Thrombozytenzahl, verminderte Gesamteiweiß- und Albuminwerte, beschleunigte Blutsenkungsgeschwindigkeit). Mitunter werden auch spezifische, zurzeit hauptsächlich im Forschungsbereich genutzte Verfahren zur Diagnostik herangezogen. Die Untersuchung auf Autoantikörper gegen exokrine Pankreasgewebe, die vor allem bei M. Crohn-Patienten gefunden werden, obwohl die Spezifität des Verfahrens umstritten ist, gehört zu den am weitesten entwickelten (Sandborn 2004).

Die endgültige Diagnose wird meist durch bildgebende Verfahren gestellt. Die derzeit wichtigste Diagnosemethode ist die Prokto-Rekto-Sigmoidoskopie und Koloileoskopie. Im Rahmen der endoskopischen Diagnostik werden üblicherweise Biopsien nach einem festgelegten Schema (Leitlinien der DGVS) durchgeführt. Damit ist eine histopathologische Differenzialdiagnose in 86 % mit hoher Spezifität und Sensitivität möglich. Allerdings gibt es kein histologisches Kriterium, das allein beweisend für die Erkrankung ist. Nur in etwa 20 % der Biopsien sind Epitheloidzellgranulome zu finden, denen in der Diagnostik des M. Crohn eine Schlüsselrolle zugeschrieben wird (Lorenzen 2002).

Durch röntgenologische Untersuchungsverfahren (Abdomenübersicht, Kolonkontrasteinlauf, Dünndarmdarstellung nach Sellink, fraktionierte Dünndarmpassage) kann

die Diagnose gesichert und Komplikationen (Stenosen, Fisteln, Konglomerate) identifiziert werden. Der transabdominale Ultraschall als nichtinvasive Diagnosemethode nimmt in der Primärdiagnostik und Verlaufsbeobachtung eine wichtige Stellung ein. Sonographische Untersuchungen werden von den Patienten im Regelfall gut toleriert und sind für gehäufte Verlaufskontrollen geeignet. Die neuen gefäßdiagnostischen Untersuchungsmethoden mit Beweisen für erhöhten Blutfluss in der Darmwand und den Mesenterialgefäßen als Zeichen erhöhter Entzündungsaktivität werden an Bedeutung gewinnen.

Die Untersuchungsmethoden der CT und der MRT können unklare Befunde ergänzen, um pathologische Prozesse zu charakterisieren, Abszesse zu lokalisieren und differentialdiagnostisch ein akutes Abdomen (z. B. Pankreatitis) von einem akuten Schub zu unterscheiden, wenn andere Nachweismethoden kein eindeutiges Ergebnis liefern. Kontrastgebende Verfahren sind dabei sicherer in der Aussage. Ebenso spielt das MRT eine Rolle bei der Diagnose von Komplikationen, die sich vornehmlich im kleinen Becken lokalisieren.

Die Therapie der Erkrankung M. Crohn ist zunächst grundsätzlich konservativ. Ziel der Behandlung ist es, die Symptome zu lindern, eine Remission zu erreichen und diese Intervalle so lange wie möglich zu erhalten. Dabei sollen Komplikationen vermieden und operative Eingriffe möglichst hinausgeschoben werden. Die aktuellen Therapierichtlinien richten sich nach der Verlaufsform der Erkrankung (rezidivierende, chronisch aktive oder fulminante Form). Die medikamentöse Therapie richtet sich nach Befallslokalisation, Schwere des Erkrankungsschubs bzw. Krankheitsstadium. Therapiestandard ist die Behandlung mit Aminosalizylaten (5-ASA) mit ihren multiplen Angriffspunkten zur Hemmung der Entzündungsreaktion, Kortikosteroide mit der regulatorischen Wirkung auf die Proteinsynthese und Azathioprin/6-Mercaptopurin als klassische Immunsuppressiva mit ihrer zytostatischen Wirkung (Reduktion der T-Lymphozyten, Plasmazellen und „Natural Killer Cells“). Die Verwendung von Medikamenten mit spezifischen Angriffspunkten (Cyclosporin, Tacrolimus, TNF- α -Antikörper) bleibt besonders schwierigen klinischen Situationen und Studien vorbehalten. Neueste Ansatzpunkte werden im Einsatz von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und IL-11 gesehen. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Störung der Bildung des ICAM-1 mittels Antisense-Oligonukleotiden (Herrlinger und Stange 2000, Fiocchi 2005).

Neben der konservativ-medikamentösen Therapie kann es bei Therapieversagen zur chirurgischen Intervention kommen. Darmresektionen bei M. Crohn sind aufgrund der hohen Rezidivrate und des häufigen Dünndarmbefalls jedoch nur als letzte Option indiziert. Häufige Indikationen zu operativen Eingriffen sind Fistelsanierung, Strikturbeseitigung (auch durch Ballondilatation möglich), Notfalloperationen bei Ileus, Perforation oder Abszessen.

Bei der **Colitis ulcerosa** sind die Symptome abhängig von der Ausdehnung der Erkrankung und können bis zu wässrig-blutigen Stühlen oder Absetzen von reinem Blut führen. Die Betroffenen leiden unter heftigem Stuhldrang, der bis zur funktionellen Inkontinenz führen kann. Extraintestinale Symptome wie Arthralgien (10–30 % der Patienten), Ophthalmopathien (5–15 %) oder dermatologische Beteiligung (10–15 %) können auftreten (Fiocchi 1998).

Der typische schubweise Verlauf der C. ulcerosa kann schleichend sein, aber auch als fulminante Attacke mit ausgeprägter Toxämie auftreten (Bosseckert und Günther 1980, Lehmann 2003). Nach den Symptomen wird das Krankheitsbild in 3 Schweregrade (mäßige Kolitis, mittelschwere Kolitis, schwere Kolitis) eingeteilt.

Die C. ulcerosa ist in den Verlaufsformen durch das Auftreten schwerwiegender Komplikationen gekennzeichnet. Gefürchtet sind das toxische Megakolon (rasche Dilatation des Kolon, Meteorismus, Intoxikationszeichen wie Tachykardie und Fieber), Kolonperforation, unstillbare Blutungen und Entwicklung eines Karzinoms, welches bei Krankheitsverlauf >10 Jahre statistisch signifikant gehäuft auftritt.

Die Diagnose C. ulcerosa ergibt sich aus der Anamnese und der Befundkonstellation. Dabei ist die Labordiagnostik ebenfalls eher unspezifisch (Anämie, Leukozytose mit pathologischer Linksverschiebung, Azidose, blutungsabhängig ein Abfall der Gerinnungsfaktoren). Ein spezifisches Verfahren der Diagnostik ist die Bestimmung der ANCA. Diese Autoantikörper sind offenbar verwandt, aber nicht identisch mit den Antikörpern anderer immunologischer Krankheiten und die Zielantigene scheinen andere zu sein (Raedler und Schreiber 1992). Die Sensitivität und Spezifität des serologischen ANCA-Nachweises bei Patienten mit C. ulcerosa ist sehr vom verwendeten Test abhängig (Sandborn et al. 2001).

Grundlegende Diagnosemittel sind ebenfalls Endoskopie und Röntgendiagnostik. Wichtig ist die histologische Beurteilung der Biopsien, die bei ausgeprägter Entzün-

dung der Mucosa eindeutig ist (Infiltration mit Entzündungszeichen, Kryptenabszesse, oberflächliche Ulcerationen und Blutungen, Verlust von Becherzellen). Bei den Röntgenuntersuchungen sind Erosionen und Ulcerationen (Kragenknopf-ulcerationen) sichtbar, die als samtartiges Schleimhautrelief bezeichnet werden und neben weiteren typischen Zeichen (Haustrienabflachung, Reduzierung der Darmdehnbarkeit, Doppelkonturen) zur Diagnose führen. Im Stadium der Remission werden oft entzündliche Pseudopolypen gefunden, die karzinomverdächtig sein können (Feuerbach und Schölmerich 2000).

Die Therapiekonzepte bei *C. ulcerosa* richten sich nach den Verlaufsformen der Erkrankung. Es gibt keine Kausaltherapie. Die symptomatische Behandlung zielt auf die unspezifische Hemmung der Entzündungsreaktion wie bei *M. Crohn* (5-ASA, Kortikosteroide, Azathioprin). Handelt es sich bei der Verlaufsform um eine steroidabhängige oder steroidrefraktäre akute oder chronisch-aktive *C. ulcerosa*, spricht die Standardtherapie definitionsgemäß nicht an. Alternativ werden dann Immunsuppressiva eingesetzt (Azathioprin) oder Cyclosporin bzw. Tacrolimus mit ihren spezifischen Angriffspunkten kommen zur Anwendung. Der Einsatz bleibt aber problematischen Situationen vorbehalten. Therapieversuche mit Leukapherese und andere Techniken werden als Alternativen ausprobiert (Emmrich 2002, Sandborn 2006).

Etwa 20 % der Patienten mit *C. ulcerosa* sind medikamentös austherapiert und werden chirurgisch weiterbehandelt. Die Kolektomie führt in aller Regel zur Heilung, da sich die Entzündung nur auf die Kolonschleimhaut bezieht. Bei fulminantem oder ausgesprochen langjährigem Verlauf stellt die Resektion eine kurative Option, insbesondere als Karzinomprophylaxe, dar.

Vorwiegend aufgrund von Therapieversagen im akuten Schub, Versagen bei der Remissionserhaltung und gravierender Nebenwirkungen, insbesondere bei der Langzeittherapie, steht in vielen Fällen noch keine dauerhaft zufrieden stellende Therapie zur Verfügung. Die frühzeitige Identifizierung und Aufklärung solcher Ausnahmefälle stellt eine wissenschaftliche Herausforderung dar.

Viele Gemeinsamkeiten im Verlauf und den Therapieansätzen lassen Vergleiche zu Erkrankungen zu, die aus dem Autoimmunbereich stammen (Multiple Sklerose, Autoimmunhepatitis, Systemische Sklerose).

3.2 Immunologische Prozesse bei M. Crohn und C. ulcerosa

Im Folgenden werden immunpathologische Prozesse bei M. Crohn und C. ulcerosa näher beschrieben

Das Darmlumen des Menschen stellt mit schätzungsweise 400 m² eine der größten Kontaktflächen zur Umwelt dar und ist gleichzeitig für Versorgungs- und Abwehraufgaben zuständig.

Um die zahlreichen Aufgaben der Immunabwehr zu erfüllen, haben sich im Darm spezialisierte Kompartimente mit einzigartigen immunologischen und immunregulatorischen Charakteristika entwickelt (Duchmann et al. 1999). Dazu gehören: Peyer'sche Plaques, mesenteriale Lymphknoten, Appendix, lymphatische Follikel direkt unter dem Epithel und lymphatische Infiltrationen in der Lamina propria.

Prinzipiell werden 3 grundlegende Theorien zur Entstehung der CED diskutiert.

Diese Theorien gehen davon aus, dass entweder eine Störung der Mukosabarriere, eine persistierende intestinale Infektion oder eine Fehlregulation der Immunantwort gegenüber körpereigenen Antigenen eine CED auslösen (Auer 1991).

Theoretisch wird für beide Erkrankungen eine chronische Fehlregulation der mucosalen und auch der systemischen Immunreaktion angenommen. In diesem Rahmen spielen verschiedene proinflammatorische und antiinflammatorische Mediatoren eine wichtige Rolle. Einige Autoren gehen von der Störung der spezifischen Toleranz als Schutzmechanismus des Körpers aus (Duchmann et al. 1999).

Die intestinale Immunantwort wird durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ) initiiert. Die Darbietung des Antigens erfolgt im Zusammenhang mit dem MHC-Komplex und führt zu einer Aktivierung der T-Zellen. Einerseits können zytotoxische T-Zellen stimuliert werden, andererseits aber auch eine Antikörperbildung (durch B-Zellen) ausgelöst werden. Einige Untersuchungen zeigen bei Patienten mit CED ein Ungleichgewicht von T-Zellpopulationen. Bei Patienten mit CED zeigen die T-Zellen einen vermehrten Grad der Aktivierung und sind in Tiermodellen für die Entwicklung einer CED verantwortlich (Duchmann et al. 1997, Erhardt 1997, Sartor 1997, Powrie 1997).

Patienten mit CED weisen eine vermehrte Produktion von durch Monozyten, Makrophagen oder Granulozyten synthetisierten Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene, Plättchenaktivierender Faktor, Zytokine) auf. Bezüglich der lymphozytären Zytokinsynthese findet sich bei Patienten mit M. Crohn ein

Th-1-typisches Zytokinmuster (vermehrte Produktion von $\text{TNF-}\alpha$, IL-2, $\text{INF-}\gamma$), während bei Patienten mit *C. ulcerosa* ein Th-2-typisches Muster (vermehrte Produktion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) vorliegt (Neurath und Schürmann 2000, Lehmann 2003).

Dazu werden bei der **C. ulcerosa** in der Mucosa erhöhte IL-5 Konzentrationen gefunden, was auf eine verstärkte Th-2- Aktivität hinweist. In der IgG-Subklassen-Analyse sind IgG₁ und IgG₃ erhöht. Das zusätzliche Auftreten von ANCA und deren Bedeutung hinsichtlich des Vorliegens einer Autoimmunkrankheit lassen vermuten, dass es sich bei der *C. ulcerosa* um eine Autoimmunerkrankung handelt (Burmester et al. 1998).

Eine Studie weist darauf hin, dass bei Patienten mit *C. ulcerosa* die Zahl der Th-1-Zellen und Th-2-Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse von peripherem Blut höher ist als bei gesunden Kontrollpersonen (Suzuki et al. 2000).

Aus den bisherigen Ausführungen wird deutlich, dass den T-Zellen eine zentrale Bedeutung bei den immunologischen Aspekten für *M. Crohn* und *C. ulcerosa* zukommt.

Sämtliche T-Zellen exprimieren unabhängig vom Differenzierungsgrad das transmembranöse Glykoprotein CD45.

Das Molekül CD45 ist von entscheidender funktioneller Bedeutung für die T-Zellen und wurde als ein zentrales Schlüsselmolekül des Immunsystems bei Patienten mit *M. Crohn* und *C. ulcerosa* sowie gesunden Blutspendern mit unterschiedlichen Analyseverfahren in dieser Arbeit untersucht.

Die Eigenschaften und Merkmale des Moleküls CD45 werden im anschließenden Kapitel kurz erläutert.

3.3 Biologie des CD45

Das Molekül CD45 ist ein transmembranöses Glykoprotein, das von sämtlichen hämatopoetischen Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten und Thrombozyten in großer Dichte (bis zu 10 % aller Oberflächenmoleküle) exprimiert wird. Es wird auch als „Common Leucocyte Antigene“, T220 oder B220 bezeichnet.

Das CD45 Gen liegt auf Chromosom 1 (Ralph et al. 1987), hat eine Größe von 130kb (Fernandez-Luna et al. 1991) und besteht aus 33 Exons (Hall et al. 1988).

Das Protein gliedert sich in eine extrazelluläre Domäne, eine transmembranöse Domäne (Tm) und eine intrazelluläre Domäne (siehe Abbildung 1).

Die transmembranöse Domäne besteht aus hydrophoben Aminosäuren und sorgt für die Verankerung des Proteins in der Zellmembran.

Im intrazellulären Abschnitt des CD45 Moleküls sind zwei Phosphatasedomänen lokalisiert, wodurch eine ausschlaggebende Beteiligung an verschiedenen immunologischen Signaltransduktionsprozessen ermöglicht wird (Donovan and Koretzky 1993).

Die erste Domäne beherbergt das aktive Zentrum der Phosphatase, während die zweite Domäne keine Phosphataseaktivität besitzt und regulatorische Funktionen übernimmt. Dieser Phosphataseaktivität des Moleküls CD45 wird eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von T-Zellen zugeschrieben (Trowbridge and Thomas 1994).

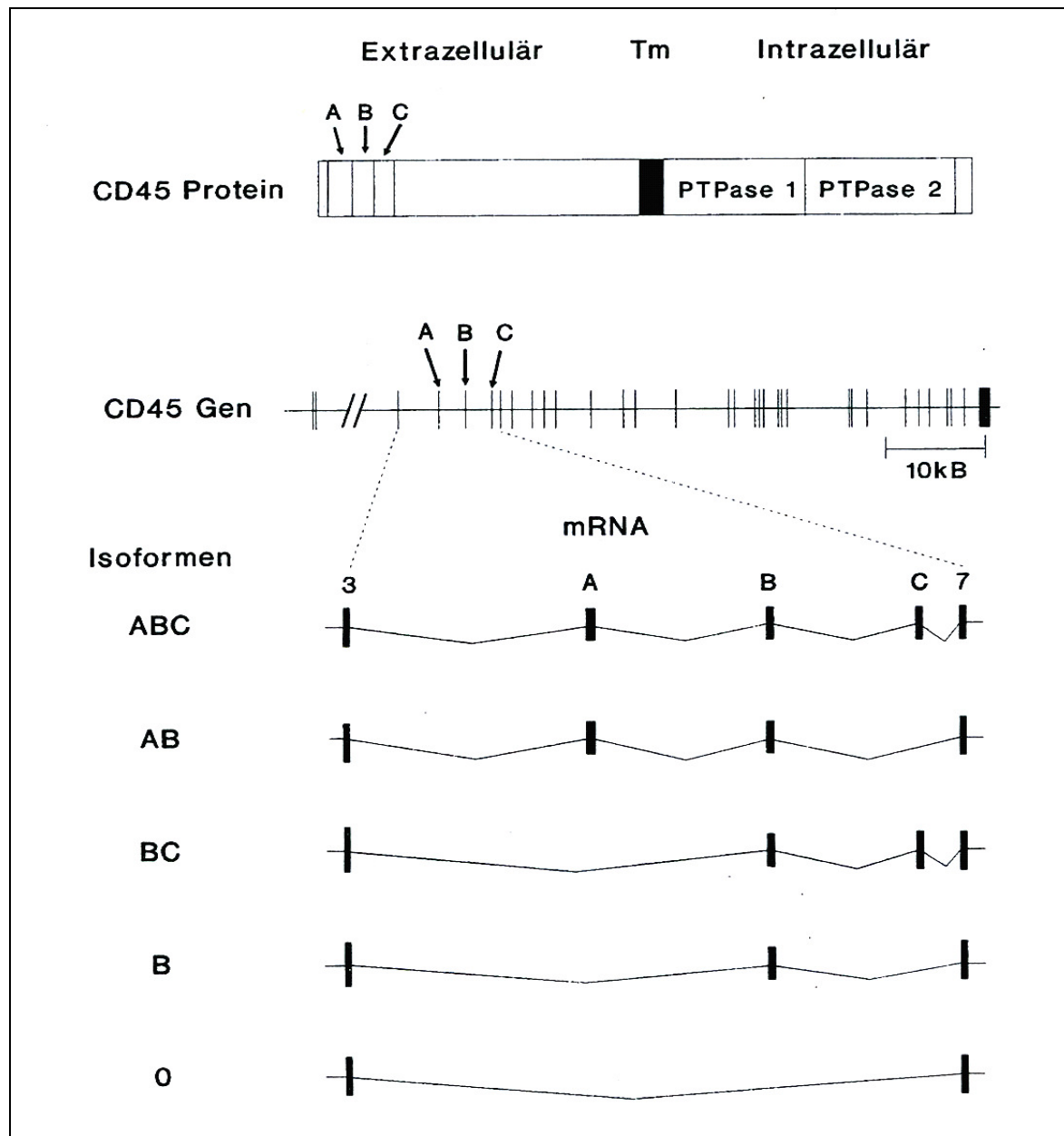


Abb.1: Struktur des CD45 Moleküls und Bildung der verschiedenen humanen CD45 Isoformen durch alternatives Spleißen

Im oberen Teil des Bildes wurde schematisch die Struktur des CD45 Moleküls dargestellt. Das Molekül besteht aus einem extrazellulären Bereich, einem transmembranösen Bereich (Tm) und einem intrazellulären Bereich mit zwei Protein-Tyrosin-Phosphatasedomänen (PTPase 1 und 2), von denen nur die erste enzymatisch aktiv ist. Die Pfeile bezeichnen Aminosäurebereiche, die durch die variabel verwendeten Exons A, B und C kodiert werden. Im mittleren Teil des Bildes ist das CD45 Gen dargestellt. Jedes Exon ist durch einen Strich markiert und die variabel verwendeten Exons A, B und C sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Der untere Teil des Bildes gibt schematisch fünf verschiedene mRNA Spezies wieder, die aus dem jeweiligen Spleißprozess resultieren und für die bisher nachgewiesenen humanen CD45 Isoformen (ABC, AB, BC, B und 0) kodieren. (Thude 1996)

Die Erkenntnisse beruhen auf dem Vergleich der Aktivierung von CD45-exprimierenden Zelllinien mit CD45-negativen Defektmutanten. Nach Stimulation über den T-Zellrezeptor kommt es bei CD45-negativen Varianten weder zur Zytokinproduktion noch zur Proliferation (Pingel und Thomas 1989) oder zur Zelllyse (Weaver et al. 1991). Nach Rekonstruktion des CD45 Moleküls sind diese Funktionen wieder in der gleichen Weise nachweisbar wie bei Zelllinien des Wildtyps. Bei CD45-negativen T-Zellen fehlen der Ca^{2+} - und IP_3 -Anstieg und die Tyrosinphosphorylierungen, die sonst als Zeichen der T-Zellaktivierung nachweisbar sind (Koretzky et al. 1990, 1993).

Tyrosinphosphorylierungen in der Anfangsphase der T-Zellaktivierung werden vor allem durch die Proteinkinasen $\text{p}56^{\text{lc}}k$ (Veillette et al. 1988, Dornan et al. 2002) und $\text{p}59^{\text{fyn}}$ (Isakov 1993) vermittelt. Beide Kinasen werden durch CD45 dephosphoryliert, wodurch sie aktiviert werden (McFarland et al. 1993), so dass alle weiteren Schritte der Signaltransduktionskette ablaufen können. Mit dieser Funktion kontrolliert CD45 die ersten Schritte der T-Zellsignaltransduktionskette positiv.

Zytokin- und interferonvermittelte Signaltransduktionswege benötigen phosphorylierte aktive Janus-Kinasen (Irie-Sasaki et al. 2003). Diese Kinasen werden durch CD45 dephosphoryliert, wodurch sie inaktiviert werden und die Signaltransduktionskette unterbrochen wird. Damit reguliert CD45 die Signaltransduktionskette negativ.

Der extrazelluläre Bereich des CD45 Moleküls ist stark glykosyliert und variabel gestaltet. Diese Variabilität wird durch alternatives Spleißen der Exons 4(A), 5(B) und 6(C) erzeugt. Für den Menschen sind fünf Isoformen ABC (220 kD), AB (205 kD), BC (200 kD), B (190 kD) und 0 (180 kD, kein variables Exon) mit den in Klammern angegebenen unterschiedlichen Molekulargewichten beschrieben worden (Streuli et al. 1987). Sie sind in Abbildung 1 im unteren Abschnitt schematisch dargestellt.

Die Oberflächenexpression der Peptidabschnitte, die von den Exons A, B und C kodiert werden, kann mit den monoklonalen Antikörpern CD45RA, CD45RB und CD45RC detektiert werden. Ein CD45RA Antikörper reagiert z. B. mit den Isoformen ABC und AB, weil in diesen Isoformen Exon A kodierte Peptidabschnitte vorkommen. Ein CD45RB Antikörper detektiert die Isoformen ABC, AB, BC und B,

während ein CD45RC Antikörper mit den Isoformen ABC und BC reagiert. Ein CD45R0 Antikörper reagiert ausschließlich mit der Isoform 0. Somit sind CD45RA-, RB-, RC- und R0- Antikörper wertvolle analytische Werkzeuge, um die Expression der entsprechenden Peptidsequenzen zu studieren. Unter Nutzung dieser Antikörper konnte gezeigt werden, dass der Prozess des alternativen Spleißens in Abhängigkeit vom Differenzierungs- und Reifungsgrad des Leukozyten gesteuert wird. Besonders ausgeprägt ist dieses Merkmal bei T-Zellen (Clement 1992).

T-Zellen ohne Antigenkontakt exprimieren die Isoformen ABC, AB, B und BC, aber nicht die Isoform 0. Da diese Zellen mit einem CD45RA Antikörper reagieren, jedoch nicht mit einem CD45R0 Antikörper, werden sie als CD45RA+/CD45R0- T-Zellen bezeichnet. T-Zellen mit diesem CD45 Expressionsmuster werden auch als naive T-Zellen bezeichnet. Nach einer Aktivierung kommt es zu markanten Veränderungen im CD45 Expressionsmuster. Aktivierte T-Zellen exprimieren nur noch die Isoformen B und 0. Solche aktivierten T-Zellen werden im Gegensatz zu naiven/nicht aktivierten Zellen als CD45RA-/CD45R0+ memory T-Zellen deklariert.

Naive und memory T-Zellen unterscheiden sich in ihren funktionellen Eigenschaften (Trowbridge and Thomas 1994).

Die einzelnen molekularen Details der Regulation des alternativen Spleißprozesses bei CD45 sind bisher noch nicht komplett entschlüsselt (Desai et al. 1993). In den Exons A und C wurden Regionen definiert, die bedeutsam für das Spleißen sind. Es wird angenommen, dass an die jeweilige Region im Exon ein transagierender Spleißfaktor bindet, wodurch das jeweilige Exon aus der unreifen mRNA entfernt wird. Möglicherweise induziert eine T-Zellaktivierung eine erhöhte Syntheserate für diese Spleißfaktoren oder aber diese Spleißfaktoren werden selbst durch die Aktivierung angeregt, so dass bei aktivierten T-Zellen die Exons A und C quantitativ aus der unreifen mRNA entfernt werden (Penninger et al. 2001).

Aus der Umstellung des Spleißprozesses resultiert der phänotypische Wandel von naiven CD45RA+/CD45R0- T-Zellen zu memory CD45RA-/CD45R0+ T-Zellen, die im Zuge der Aktivierung der T-Zellen entstehen.

Dieser Vorgang ist in Abbildung 2 Bild A schematisch veranschaulicht.

Diesem klassischen CD45 Expressionsmuster der T-Zellen steht ein variantes CD45 Expressionsmuster gegenüber.

Hier exprimieren trotz Aktivierung alle memory T-Zellen weiterhin die Isoform AB, wodurch sie CD45RA+ bleiben (Abbildung 2 Bild B).

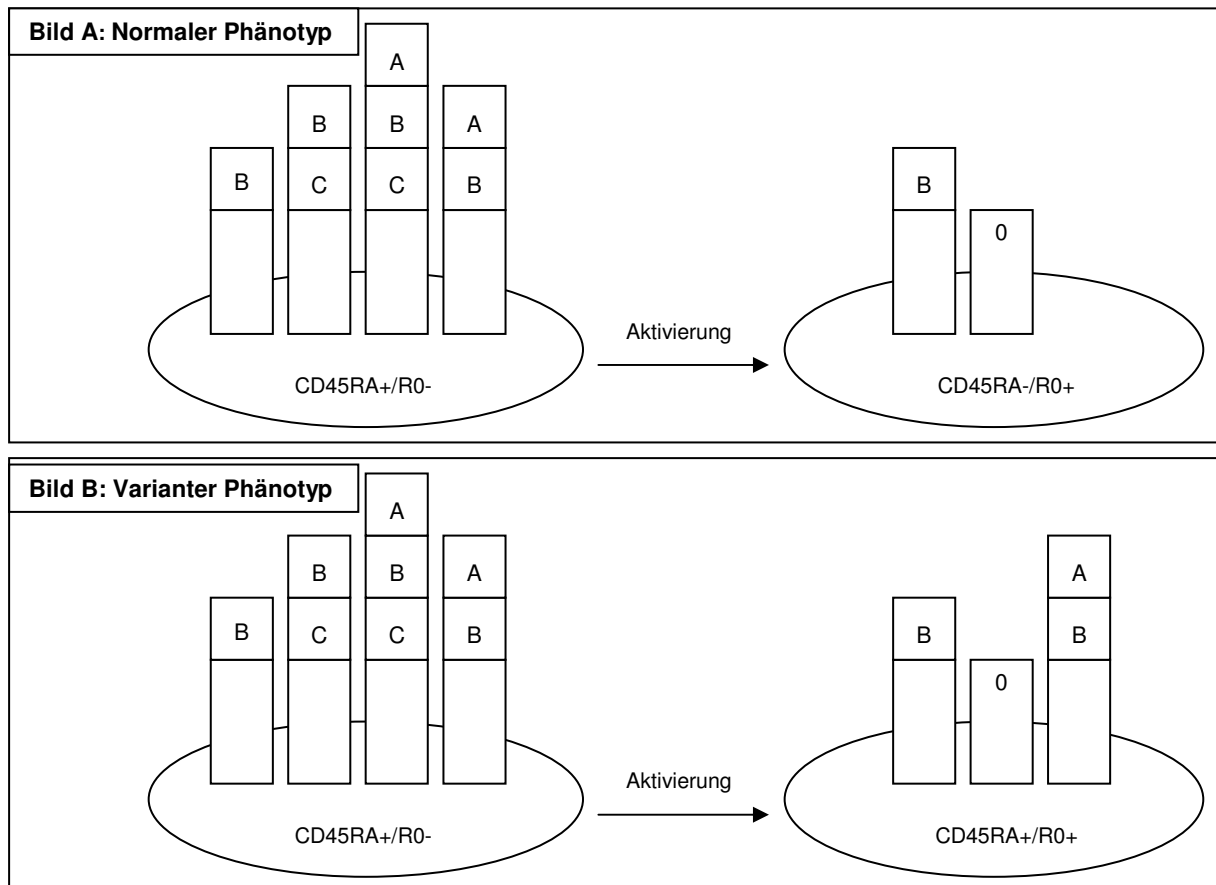


Abb.2: Vereinfachte Darstellung der Isoformen des Moleküls CD45 bei T-Zellen

Bild A zeigt den klassischen Phänotyp einer T-Zelle vor und nach einem Aktivierungsprozess

Bild B zeigt eine T-Zelle mit einem regulatorischen CD45RA Polymorphismus, der durch die Punktmutation im Exon A verursacht wird. Sämtliche aktivierte T-Zellen exprimieren weiterhin die Isoform AB, wodurch ein variantes CD45RA Expressionsmuster bei T-Zellen entsteht.

Das variante CD45RA Expressionsmuster wird durch eine Punktmutation im Exon A verursacht. An Position 77 des Exons ist die Base Cytosin (C) durch die Base Guanosin (G) ausgetauscht worden. Diese Transversion hat keinen Aminosäureaustausch zur Folge. Die Punktmutation liegt in einer Region des Exon A, die bedeutsam für den Spleißprozess ist (Zilch et al. 1998). Möglicherweise wird durch die Punktmutation eine Erkennungssequenz für einen transagierenden Spleißfaktor verändert, so dass seine Bindung ausbleibt und das Exon nicht aus der unreifen mRNA herausgeschnitten werden kann. Die nachgewiesene permanente Expression von Exon A kodierten Peptidsequenzen resultiert aus diesem regulatorischen Polymorphismus (Abbildung 2 Bild B). In allen bisherigen Veröffentlichungen zu der beschriebenen Punktmutation wurden nur heterozygote Merkmals-träger gefunden. Ein homozygoter Träger wurde bisher nicht beschrieben.

Die Frequenz der Mutation beträgt in Deutschland ca. 1 % (Wood 2002, Thude et al. 2004, 2005). Sie tritt geschlechterunabhängig, HLA-Antigen unabhängig und Blutgruppenantigen unabhängig auf (Schwinzer and Wonigeit 1990, Scott et al. 1991).

Ob durch die Punktmutation die funktionellen Eigenschaften der T-Zellen verändert werden, ist bisher unbekannt. Allerdings ist sehr wahrscheinlich, dass durch sie die T-Zellaktivitäten beeinflusst werden, weil das Auftreten der Punktmutation mit verschiedenen Autoimmunkrankheiten assoziiert ist.

Zwei Studien haben einen Zusammenhang zwischen der C zu G Transversion im Exon A des CD45 Gens und der Entwicklung von Multipler Sklerose (Jacobsen et al. 2000, Ballerini et al. 2002) dargestellt. Andere Autoren konnten diese Assoziation nicht bestätigen (Vorechovsky et al. 2001, Barcellos et al. 2001, Mitterski et al. 2002). Weitere Veröffentlichungen zeigen eine Assoziation bei verschiedenen anderen Autoimmunerkrankungen wie bei schwerem kombiniertem Immundefekt (SCID; Kung et al. 2000) und systemischem Lupus erythematodes (SLE; Neidhart et al. 1996) Sklerodermie (Schwinzer et al. 2003) und Autoimmunhepatitis (Vogel et al. 2003).

Im Gegensatz zu den vorhandenen Assoziationen konnten allerdings für die Autoimmunerkrankungen Diabetes mellitus Typ I und rheumatoide Arthritis keine Assoziationen nachgewiesen werden (Wood et al. 2002, Thude et al. 2004, Mitterski et al. 2004). Außerdem wurde keine Assoziation zu der Erkrankung Dilatative

Kardiomyopathie gefunden, für die ebenfalls autoimmunologische Faktoren diskutiert werden (Thude et al. 2005).

Neben dem varianten CD45RA Expressionsmuster wurde auch ein variantes CD45RC Expressionsmuster beschrieben. Dieses variante Expressionsmuster mit der Punktmutation A zu G an Position 138 des Exon C des CD45 Gens tritt mit hoher Frequenz in der asiatischen Population auf, während es in der kaukasischen Bevölkerung extrem selten vorkommt. Bei Japanern wurde eine Häufigkeit von 23,7 % ermittelt und bei Koreanern 7,3%, dagegen bei Italienern 1,7 % und Engländern nur 0,4 %. Die A zu G Variante des CD45 zeigt im peripheren Blut eine Häufung der CD45R0+ Zellen und einen Verlust naiver CD45RA T-Zellen. Diese beschriebene Punktmutation bewirkt, dass das Exon C vermehrt aus der unreifen mRNA herausgeschnitten wird. Verbunden mit der Mutation wird ein selektiver Überlebensvorteil vermutet und eine Verbindung mit Autoimmunerkrankungen und Virusinfektionen gesehen (Stanton et al. 2003, Boxall et al. 2004).

Ausgiebige Krankheitsassoziationsstudien fehlen bisher für diese Mutation.

4 Ziele der Arbeit

Es wurde beschrieben, dass die C zu G Transversion an Position 77 im Exon A des CD45 Gens mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert ist. Bisher ist nicht eindeutig sichergestellt, welche autoimmunologischen Komponenten für den Pathomechanismus von M. Crohn und C. ulcerosa von Bedeutung sind.

Darum hatte die vorliegende Arbeit in einem ersten elementaren Themenkomplex zum Ziel, zu analysieren, ob bei Patienten mit M. Crohn (n = 111) oder C. ulcerosa (n = 72) eine Assoziation zwischen der Punktmutation im Exon A des CD45 Gens und den Erkrankungen besteht. Als Kontrolle diente ein Kollektiv von gesunden, freiwilligen Blutspendern (n = 200).

Die Ergebnisse der Analysen können dazu beitragen, eine bessere Einschätzung von autoimmunologischen Prozessen für beide Erkrankungen vorzunehmen.

Darüber hinaus kann der Nachweis einer bestehenden Assoziation einen Hinweis geben, ob von der Punktmutation im Exon A eine prädisponierende Wirkung für die Erkrankungen M. Crohn oder C. ulcerosa ausgeht.

Das Ergebnis der Analysen könnte möglicherweise auch Auswirkungen auf dem diagnostischen Sektor der beiden chronischen Darmerkrankungen haben. Bisher präsentiert die Diagnostik nur wenige aussagkräftige Parameter, um M. Crohn und C. ulcerosa auf molekularer Ebene zu differenzieren. Falls die Transversion bei beiden Erkrankungen mit unterschiedlicher Frequenz auftritt, stände ein weiterer wertvoller molekularer Parameter zur Differenzierung zur Verfügung.

In einem zweiten, untergeordneten Themenkomplex wurde das CD45RC Expressionsmuster auf Lymphozyten von Patienten mit M. Crohn (n = 111), und Patienten mit C. ulcerosa (n = 72) sowie dem Kontrollkollektiv (n = 200) analysiert. Ziel war die Auffindung varianter CD45RC Expressionsmuster, wie sie in der Literatur beschrieben wurde und ggf. die Bestimmung ihrer Frequenz.

Falls variante CD45RC Expressionsmuster bei beiden Erkrankungen mit unterschiedlicher Frequenz auftreten, wäre dies ein weiteres ergänzendes Unterscheidungskriterium für beide CED.

5 Material und Methoden

5.1 Ausstattung

5.1.1 Geräte und Hersteller

Folgende Geräte und technische Hilfsmittel wurden verwendet:

Geräte	Hersteller/Vertreiber
Cell Quest Software	Becton Dickinson
Durchflusszytometer FACScalibur	Becton Dickinson
Elektrophoresekammer	Biorad
Fotoeinrichtung Polaroid	Konrad Benda
Kurzzeitwecker	Krups
Mikropipetten 0-1000µl, 0-200µl, 0-10µl	Gilson
Mikrowelle	Bosch
Peltier Thermal Cycler	Biozym Diagnostic GmbH
Photometer Gene Quant	Pharmacia
Quarzküvetten	Pharmacia
Schüttler Vortex Reax control	Heidolph
Spannungsgerät Model 1000/500	Biorad
Spannungsgerät Pac 3000	Biorad
Tellerwaage 444-45	Kern
Thermomixer comfort	Eppendorf
Zentrifuge "Biofuge pico"	Heraeus
Zentrifuge „Biofuge 13“	Heraeus

5.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Nachfolgende Chemikalien und Reagenzien wurden in dieser Arbeit verwendet:

Puregene DNA-Isolationskit,	Biozym
bestehend aus	
RBC-Lysis solution	
Cell-Lysis solution	
Protein DNA Precipitation solution	

Agarose	Sigma
Aqua dest. für Lösungen	Fresenius
Aqua dest. für DNA-Präparation (hochrein)	Braun
Auftragpuffer "Gel loading solution"	Sigma
Elektrophoreselaufpuffer Stammlösung	Apotheke der FSU
Ethanol 96 %	Baker
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Sigma
FACS flow	Optimierte Trägerflüssigkeit für Durchflusszytometer
FACS Rinse	Reinigungslösung für Durchflusszytometer
FACS safe	Desinfektionslösung für Durchflusszytometer
Isopropanol	Baker
L-Puffer	Roche
Mastermix	Genovision
Meta Phor Agarose	Biozym
Natrium Acetatlösung	Apotheke der FSU
Taq Polymerase	Applied Biosystems

5.1.3 Verbrauchslösungen

Die hier aufgelisteten Lösungen wurden für die durchflusszytometrische Analyse, die DNA-Präparation und für die RFLP-Analyse verwendet:

Alkohol 70 %	Apotheke der FSU	700 ml Ethanol 96 % verdünnt mit 300 ml Aqua dest. (DNA-Präparation)
Alkohol 80 %	Apotheke der FSU	800 ml Ethanol 96 % verdünnt mit 200 ml Aqua dest. (RFLP-Analyse)
FACS- Lyselösung	Becton Dickinson	100 ml Erythrozyten-Stamm-Lyselösung versetzt mit 900 ml Aqua dest. (FACS- Analyse)

PBS	Sigma	Lyophilisiertes Präparat (1Paket = 0,01 M phosphate buffered saline+ NaCl-0,138 M + KCl-0,0027 M; pH7,4) zur Auflösung in 1000ml Aqua dest. (FACS-Analyse)
-----	-------	--

5.1.4 Einmalartikel

Blutentnahmeröhrchen mit EDTA 3 ml, 5 ml	Sarstedt-Monovetten
mit Citrat 3 ml, 5 ml	Sarstedt-Monovetten
Eppendorf-Reagenzröhrchen 2,0 ml	Eppendorf
FACS-Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson
Fotopapier Polaroid 667	Polaroid Corporation
Latexhandschuhe, Vinylhandschuhe Größe M	Ansell, Meditrade
Pipettenspitzen - verschiedene Größen	Greiner

5.1.5 Antikörper

In dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper von verschiedenen Herstellern verwendet. Die Informationen zu den verwendeten Antikörpern sind nach folgendem Schema gegliedert:

- * Spezifität
- ~ Herkunft
- # Fluoreszenz
- ° Isotyp
- × Quelle
- Verwendung in der Arbeit

Klon: MEM 56

- * Der CD45RA Antikörper erkennt ein Exon A kodiertes Epitop des CD45 Gens, welches in den humanen CD45 Isoformen ABC (220 kD) und AB (205 kD) vorkommt.
- ~ monoklonaler Antikörper aus der Maus
- # FITC-konjugiert

- Maus IgG2b
- × Caltag Laboratories
- verwendet zur Zellfärbung bei der durchflusszytometrischen Analyse

Klon: UCHL 1

- * Der CD45R0 Antikörper erkennt die humane CD45 Isoform R0 (180kD).
- ~ monoklonaler Antikörper aus der Maus
- # R-PE-konjugiert
- Mause IgG2a
- × Caltag Laboratories
- verwendet zur Zellfärbung bei der durchflusszytometrischen Analyse

Klon: YTH 80.103

- * Der CD45RC Antikörper erkennt ein Exon C kodiertes Epitop des CD45 Gens, welches in den humanen CD45 Isoformen ABC (220kD) und BC (200kD) vorkommt.
- ~ monoklonaler Antikörper aus der Ratte
- # Antikörper ohne Fluoreszenzfarbstoffmarkierung
- IgG2b (Rat)
- × Firma BIOZOL
- verwendet zur Zellfärbung bei der durchflusszytometrischen Analyse

Klon: G15-337

- * Erkennt den Fc-Anteil von Ratten-IgG2b-Antikörpern
- ~ monoklonaler Antikörper aus der Maus
- # FITC-konjugiert
- Maus IgG2b
- × Firma Becton Dickinson
- verwendet als Sekundärantikörper bei der durchflusszytometrischen Analyse um die Bindung des CD45RC Antikörpers sichtbar zu machen.

Antikörper für Isotypkontrolle: Klon 27-35

- * Erkennt das Epitop hapten-dansyl(5-dimethylaminol)naphtalene-1-sulfonyl, das beim Menschen nicht vorkommt
- ~ monoklonaler Antikörper aus der Maus
- # FITC konjugiert
 - Maus IgG2b
- × Firma Caltag Laboratories
- verwendet zur Isotypkontrolle zum CD45RA Antikörper

Antikörper für Isotypkontrolle: MG2a01 (Produktcode Caltag Laboratories)

- * Erkennt ein nicht näher spezifiziertes Epitop, das beim Menschen nicht vorkommt
- ~ monoklonaler Antikörper aus der Maus
- # PE konjugiert
 - Maus IgG2a
- × Firma Caltag Laboratories
- verwendet als Isotypkontrolle zum CD45R0 Antikörper

Antikörper für Isotypkontrolle: Klon A95-1

- * Erkennt ein nicht näher spezifiziertes Epitop, das beim Menschen nicht vorkommt
- ~ monoklonaler Antikörper aus der Ratte
- # FITC-konjugiert
 - Rat IgG2b
- × Firma BD Biosciences
- Antikörper zur Isotypkontrolle des Sekundärantikörpers

5.1.6 Primer für PCR- und PCR-RFLP-Reaktionen

CD45RA Vorwärts-Primer von der Firma MWG Biotech synthetisiert

– 5'-ATTTATTTTGTCTTCTCCCA-3'

CD45RA Rückwärts-Primer von der Firma MWG Biotech synthetisiert

– 5'-GTTAACAACCTTTTGTGTGCCAAC-3'

- Mit dem Vorwärts- und dem Rückwärtsprimer konnte das komplette Exon A des CD45 Gens amplifiziert werden.

5.1.7 Enzym für die RFLP-Analyse

Restriktionsendonuklease der Firma Roche

- Ursprung ist das Bakterium *Acinetobacter Iwoffii* (früher *Moraxella spezie*)
- *Msp I* – Restriktionsenzym
- Konzentration: 10 U/μl
- Das Enzym erkennt die spezifische Nukleotidsequenz CCGG und spaltet diese.

5.1.8 Patienten und Kontrollpersonen

Für die Untersuchungen wurden 10 ml Citratblut von Patienten mit M. Crohn, C. ulcerosa und Kontrollpersonen benötigt. Da es sich bei den Proben um menschliches Material handelte, wurde ein Votum der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena beantragt. Die Ethikkommission erteilte für die Studie einen positiven Bescheid (Bearbeitungs-Nr.:1116-04/03). Die Patienten und Kontrollpersonen wurden entsprechend der im Ethikantrag festgelegten Richtlinien aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur freiwilligen Teilnahme an der Studie.

Bei den Kontrollpersonen handelte es sich um gesunde, freiwillige Blutspender aus dem Einzugsbereich des Instituts für Transfusionsmedizin der Universität Jena, bei denen mit Sicherheit keine Magen-Darm-Erkrankungen oder andere Erkrankungen in akuter oder chronischer Form vorlagen.

Das Patientenkollektiv gliederte sich in eine Gruppe von Patienten mit M. Crohn und in eine zweite Gruppe von Patienten mit C. ulcerosa. Die Diagnosen wurden von den Mitarbeitern der Klinik für Innere Medizin gestellt und begründeten sich auf Anamnese, klinischen Symptomen, Labordiagnostik, Ergebnissen der Koloskopie, Sonografie und Röntgenuntersuchungen. Auf die Auswahl der notwendigen Untersuchungsverfahren, deren Auswertung und Bewertung hatten nur die klinisch tätigen Kollegen der entsprechenden Fachabteilungen Einfluss. Die Übermittlung der feststehenden Diagnose für das entsprechende Krankheitsbild erfolgte mit Hilfe eines Erfassungsbogens bei Einsendung der Blutprobe zur Analyse. Es wurde kein

Unterschied nach klinischem Stadium der Erkrankung (aktiv oder Remission) und der medikamentösen Behandlung der Erkrankung getroffen. Zum Schutz der Probanden wurden alle Angaben anonymisiert übermittelt.

Die Proben wurden im Zeitraum von 1–3 Tagen nach der Blutabnahme analysiert und ausgewertet.

In der Tabelle 2 ist die geschlechtliche und altersmäßige Zusammensetzung für die Patientenkollektive und das Kontrollkollektiv detailliert zusammengestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Probandenkollektive

	Geschlecht		Alter		Gesamtzahl
	männl.	weibl.	Mittelwert	min/max	
Kontrollpersonen	140	60	32,7	18 / 63	200
Patienten mit M. Crohn	42	69	38,5	16 / 66	111
Patienten mit C. ulcerosa	38	34	46,2	12 / 76	72

5.2 Die Durchflusszytometrie

5.2.1 Funktion des Durchflusszytometers

Der erste Teil der Arbeit wurde mit dem Durchflusszytometer FACScalibur der Firma Becton & Dickinson durchgeführt. Der Begriff: "FACS" steht für Fluorescence Activated Cell Sorting. Bei diesem Verfahren werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom aufgenommen und durch eine hydrodynamische Fokussierung einzeln in einer Messzelle (Quarzküvette) an einem Laserstrahl mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 488 nm vorbeigeführt. Bei der Passage des Lichtstrahls wird durch die Zelle ein Teil des Lichtes in Vorwärtsrichtung (FSC; Forward light scatter) und ein anderer Teil des Lichtes in Seitwärtsrichtung (SSC; Side scatter) abgelenkt. Das Vorwärtstreulicht und das Seitwärtstreulicht werden durch Linsen und Blenden gebündelt und auf die Photodioden geleitet. Diese Photodioden wandeln die Lichtbündel in Abhängigkeit zu ihrer Stärke in elektronische Signale um. Danach wird jedes elektrische Signal je nach Stärke durch

ein Computerprogramm einem passenden Kanal zugeordnet, wodurch die Intensität des Vorwärts- und des Seitwärtsstreulichtes als Messwert festgelegt wird. Dabei charakterisiert das Vorwärtsstreulicht die Zellgröße, während durch das Seitwärtsstreulicht die Zellkomplexität und Zellgranularität spezifiziert werden.

Außer diesen Basisparametern detektiert das Durchflusszytometer die Expression von Oberflächenmolekülen auf den Zellen. Diese Oberflächenmoleküle werden erkannt, indem die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern beladen werden, die gegen die entsprechenden Oberflächenmoleküle gerichtet sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden monoklonale Antikörper verwendet, die mit den Fluoreszenzfarbstoffen Phycoerythrin (PE) und Fluoresceinisothiozyanat (FITC) markiert waren.

Die Merkmale dieser Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3: Charakterisierung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Fluorochrom	Absorptionsmaxima (nm)	Emissionsmaxima (nm)	Abkürzung
Fluoresceinisothiozyanat	495	530	FITC
Phycoerythrin	480	585	PE

Beide Farbstoffe können durch die Laserwellenlänge von 488 nm gemeinsam angeregt werden. Sie unterscheiden sich allerdings im Emissionsspektrum. PE emittiert Licht mit der Wellenlänge im roten Spektrumbereich. Dagegen emittiert FITC Licht einer Wellenlänge im grünen Spektrumbereich. Unter gleichzeitiger Verwendung zweier unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe (PE und FITC) für eine Zelle kann die Expression von zwei verschiedenen Epitopen auf einer Zelle qualitativ und quantitativ erfasst werden. Das emittierte Licht wird durch Filter gereinigt und nach der Fokussierung durch Linsen auf entsprechende Photomultiplier geleitet. Das optische Signal wird durch Analog / Digitalwandler in ein elektrisches Signal umgewandelt und computerunterstützt dargestellt.

Zur Auswertung der elektrischen Signale wurde das im Durchflusszytometer FACScalibur integrierte Programm „Cell Quest“ verwendet. Neben der Datenaufnahme wurde das Mehrzweckprogramm „Cell Quest“ ebenso zur

Datenanalyse genutzt. Die Eichung des Durchflusszytometers und die Auswertung der Messdaten basierten auf vorgegebenen Daten des Herstellers. Die Eichparameter für das Durchflusszytometer wurden während der gesamten Arbeit nicht verändert, um die erhaltenen Messdaten sicher vergleichen zu können. Die Analysen der Messungen wurden jeweils im Anschluss an eine Messreihe durchgeführt.

5.2.2 Färbeansätze für durchflusszytometrische Messungen

In dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper zur Identifikation von CD45RA, CD45R0 und CD45RC Epitopen eingesetzt. Durch diese Epitope werden Peptidregionen des CD45 Antigens definiert. Dafür wurden vier Färbeansätze zur Analyse eingesetzt. Es wurden ein CD45RA-FITC, ein CD45R0-PE und ein CD45RC Antikörper in Verbindung mit einem Sekundärantikörper (FITC) verwendet. Im Folgenden wird der Ablauf der Färbeansätze beschrieben:

In vier Eppendorfgefäße (1*-4*) wurde je 300 µl antikoagulierte Vollblut (enthält ca. 3×10^6 Lymphozyten) einpipettiert. Alle Ansätze wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Inkubationsschritte mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern erfolgten generell in Dunkelheit.

Erster Ansatz (1): In diesem Ansatz wurden die Leukozyten ohne Zugabe von Antikörpern untersucht. Dieser Ansatz diente als Leerkontrolle.

1. Die Blutprobe im Eppendorfgefäß 1* wurde mit 1,5 ml FACS-Lyselösung versetzt und für 12 min inkubiert. Bei dieser Reaktion erfolgte die Lyse der Erythrozyten während die Leukozyten vital blieben.
2. Im Anschluss wurde die Probe in der Zentrifuge bei 3.000 U/min für die Dauer von 5 min zentrifugiert. Die Lyselösung wurde danach abgenommen und verworfen.
3. Es schloss sich ein zweiter Lysevorgang zur Beseitigung eventuell vorhandener Resterythrozyten mit ebenfalls 1,5 ml FACS-Lyselösung aber verkürzter Inkubationszeit auf 5 min an. Ein weiterer Zentrifugationsschritt wie oben beschrieben schloss sich an. Der Überstand konnte danach wiederum verworfen werden.

4. Das Leukozytensediment wurde gewaschen, indem es mit 500 µl PBS-Pufferlösung resuspendiert und nochmals bei 3.000 U/min für 5 min zentrifugiert wurde.
5. Nach dem Abpipettieren der Pufferlösung wurde das Sediment in 200 µl frischer PBS-Lösung aufgenommen und in ein entsprechend beschriftetes FACS-Falcon-Röhrchen überführt.

Zweiter Ansatz (2): In diesem Ansatz wurden die Leukozyten mit CD45RA-FITC und CD45R0-PE Antikörpern angefärbt.

1. Für den 2. Ansatz wurden 2 µl CD45RA-FITC Antikörper und 2 µl CD45R0-PE Antikörper mit 16 µl PBS-Puffer verdünnt. Dieses ausgewählte Verdünnungsverhältnis ergab sich aus Titrationsreihen, deren Auswertung im Ergebnisteil der Arbeit dargestellt ist. Das Antikörpergemisch (20 µl) wurde dem im Eppendorfgefäß 2* bereits vorgelegten 300 µl EDTA-Blut zugegeben und gut gemischt.
2. Es folgte die Inkubation der Blutprobe mit dem Antikörpergemisch für 25 min. Danach wurde mit der Probe weiter verfahren wie im Ansatz (1). Nach zweimaliger Lyse der Erythrozyten und dem Reinigen der Leukozyten von Lysereagenzresten wurde das Sediment in 200 µl PBS aufgenommen und in ein FACS-Falcon-Röhrchen überführt (siehe Schritte 1 bis 4 des ersten Ansatzes).

Dritter Ansatz (3): In diesem Ansatz wurden die Leukozyten mit einem Sekundärantikörper, der direkt mit einem FITC-Fluoreszenzfarbstoff markiert war und gegen Ratten-IgG2b-Antikörper gerichtet war, untersucht. Diese Probe diente als Vergleichswert zur Analyse im 4. Ansatz und zeigt den Anteil von Sekundärantikörpern an, der an Leukozyten binden kann, ohne dass die Zellen vorher mit dem CD45RC Antikörper inkubiert worden sind.

1. Die Blutprobe im Eppendorfgefäß 3* wurde mit 1,5 ml FACS-Lyselösung gut gemischt und für die Zeit von 12 min inkubiert. Es schlossen sich alle Schritte bis Punkt 4 wie Ansatz (1) an.
2. Nach dem Verwerfen der Waschlösung wurden 10 µl Sekundärantikörper (1:100 mit PBS verdünnt) zum Leukozytensediment gegeben und gut

vermischt. Die Inkubationszeit betrug 25 min. Danach wurden 500 µl PBS hinzugegeben und mit dieser Waschlösung erfolgte eine Zentrifugation bei 5.500 U/min für die Dauer von 5 min.

3. Anschließend konnte der Überstand abgenommen und verworfen werden. Das Sediment wurde in 200 µl PBS-Puffer aufgenommen und in FACS-Falcon-Röhrchen umpipettiert.

Vierter Ansatz (4): In diesem Ansatz wurden die Leukozyten mit einem CD45RC Antikörper (Antikörper aus der Ratte) in Kombination mit dem oben beschriebenen Sekundärantikörper analysiert. Da der spezifische RC-Antikörper aus der Ratte stammt und selbst ohne Fluoreszenzfarbstoff war, musste die Antigen-Antikörperbindung des CD45RC Antikörpers mit dem verwendeten FITC-markierten Sekundärantikörper (Antikörper gegen Ratte IgG 2b) nachgewiesen werden.

Zu der Blutprobe im Eppendorfgefäß 4* wurden 20 µl unverdünnter CD45RC Antikörper gegeben und gut vermischt. Die Inkubationszeit betrug 25 min.

1. Es schlossen sich die Schritte 1 bis 4 wie bei Ansatz (1) an.
Im darauf folgenden Schritt wurden 10 µl Sekundärantikörper (1:100 mit PBS verdünnt) zum Leukozytensediment gegeben und gut vermischt.
4. Nach der Inkubationszeit von 25 min wurde das Eppendorfgefäß mit 500 µl PBS aufgefüllt, bei 5.500 U/min zentrifugiert und der Überstand abgenommen und verworfen.
5. Das Sediment wurde in 200 µl PBS-Puffer aufgenommen und in das vierte FACS-Falcon-Röhrchen überführt.

Die Messung der Proben im Durchflusszytometer erfolgte im unmittelbaren Anschluss an die Färbeansätze.

5.3 DNA-Analysen

5.3.1 Präparation der DNA

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine genetische Analyse zum Nachweis für die Punktmutation an Position 77 im Exon A des CD45 Gens eingesetzt. Als Ausgangsmaterial für die DNA-Isolierung wurde Citrat-antikoaguliertes Blut oder EDTA-Blut verwendet. Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen DNA-Isolierungskit „Puregene“ der Firma Biozym. Die Isolierungsschritte gliedern sich folgendermaßen:

1. In ein Eppendorfreagenzgefäß wurden 900 µl RBC Lysis solution vorgelegt. Anschließend wurden 300 µl Citratblut hinzugegeben. Die Probe wurde 10 min inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Probe wiederholt kräftig geschüttelt, um eine komplette Lyse aller Erythrozyten zu erreichen. Nach der Inkubationszeit wurde die Probe bei 13.000 U/min für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das weiße Zellsediment aus Leukozyten wurde weiter bearbeitet.
2. Das Zellsediment wurde nun in 300 µl Cell Lysis Solution resuspendiert, bis eine homogene Lösung vorhanden war. Hierbei fand die Lyse der Leukozytenmembranen statt, wodurch die DNA und die Proteine der Zellen freigesetzt wurden.
3. Anschließend wurde die Probe mit 100 µl Protein Precipitation Solution aufgefüllt und im nächsten Schritt für 30 Sekunden bei hoher Umdrehungszahl gevortext, wobei rote Sedimente als Zeichen einer Proteinausfällung sichtbar wurden. Es erfolgte wieder ein Zentrifugationsschritt mit 13.000 U/min für 3 min.
4. Der Überstand wurde in ein Eppendorfreagenzgefäß überführt, das 300 µl 100%iges Isopropanol enthält. Durch 50-maliges Schwenken des Gemisches um 180° bildeten sich weiße DNA-Fäden als Ausfällungsprodukt, weil die DNA in Isopropanol ausfällt.
5. Nach erneutem Zentrifugieren bei 13.000 U/min für 1 min und abpipettieren des Überstandes verblieb die DNA im Reaktionsgefäß, die mit 300 µl 70%igem Ethanol zur Elimination störender Proteinreste gewaschen wurde. Es folgte wiederum eine Zentrifugation mit 13.000 U/min für 1 min. Der alkoholische Überstand wurde dann verworfen.

6. Die Eppendorfgefäße wurden bei Raumtemperatur für mindestens 15 min zum Abdampfen des Alkohols aufgestellt. Es wurde darauf geachtet, dass keine Alkoholreste im Eppendorfgefäß verblieben, denn derartige Reste hätten die nachfolgende PCR-Reaktion gestört. Nachdem der Alkohol komplett abgedampft war, wurde die DNA über Nacht bei Raumtemperatur in 50 µl Aqua dest. gelöst. Die gewonnene DNA konnte bei -30° C eingelagert werden.

5.3.2 Quantifizierung der DNA

Zur Quantifizierung der DNA wurde das Photometer Gene Quant der Firma Pharmacia verwendet. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte im Photometer bei 260 nm (A 260). Ein Wert A 260 von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Das Gerät wurde vorab kalibriert mit der Messung von Aqua dest. Hierfür wurden 70 µl Aqua dest. in eine saubere Quarzküvette gegeben. Die Eichung erfolgte nach den Schritten, die vom Photometer angezeigt wurden. Für die Probenmessungen wurde ebenfalls ein Volumen von 70 µl verwendet. Die Probenmessungen erfolgten nach der Arbeitsvorschrift, die durch das Gerät vorgegeben war. Die erhaltenen DNA-Konzentrationen für die einzelnen Proben wurden notiert. Lag die Konzentration unter 30 µg/ml wurde die Präparation verworfen und es erfolgte eine Wiederholung der DNA-Gewinnung.

Neben der Quantifizierung konnte zusätzlich die Reinheit der DNA bestimmt werden. Dazu liefert das Photometer einen Verhältniswert, der sich aus der Extinktion bei 260 nm durch die Extinktion bei 280 nm berechnet.

Optimale Messergebnisse der DNA sollten ein Extinktionsverhältnis OD260/OD280 zwischen 1,6 und 2,0 zeigen. Werte, die in diesem Bereich liegen, zeigen eine optimale Reinheit an. Liegen die Werte über 2,0 deutet dies auf RNA-Kontamination hin. Werte unter 1,6 zeigen eine Proteinkontamination an. Lagen die Werte über 2,0 oder unter 1,6 wurde die DNA verworfen und es erfolgte eine erneute Präparation.

5.3.3 PCR-Reaktion

Nachdem die DNA präpariert worden ist, diente sie als Ausgangsmaterial für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Vermehrung von definierten DNA-Abschnitten. Mit Hilfe der thermostabilen DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) und geeigneten synthetisch hergestellten Oligonukleotiden (Primer), die die zu amplifizierende Genregion flankieren, wird in mehreren thermischen Reaktionsschritten ein ausgewählter Bereich der DNA-Proben vervielfältigt. In dieser Arbeit war das Exon A mit dem beschriebenen C zu G Polymorphismus an der Position 77 des CD45 Gens der Zielbereich, der amplifiziert wurde. Jeder Zyklus war in 3 Phasen untergliedert:

1. Denaturierung der doppelsträngigen Matrizen-DNS in Einzelstränge (hohe Temperatur, 94 °C)
2. Anlagerung der Primer (Startmoleküle) an die entsprechenden komplementären Sequenzen der Matrizen-DNS (Temperaturspezifische Reaktion jedes Primers)
3. Verlängerung („extension“) der Primer durch die Taq-Polymerase (Temperaturoptimum 72 °C).

In der Arbeit wurde der automatische Thermozykler PTC-225 (Peltier Thermal Cycler) der Firma Biozym verwendet. Der Ablauf wurde in Anlehnung an die veröffentlichte Publikation von Mitterski et al. (2002) gestaltet.

Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug 40,5 µl. Für die Analysen wurden 18 µl DNA mit einer Zielkonzentration von 30 ng/µl verwendet. Dazu wurden zu 15 µl Master Mix der Firma Genovision, 3 µl Vorwärts-Primer (synthetisiert von der Firma MWG Biotech), 3 µl Rückwärts-Primer (wie oben) und 1,5 µl Taq Polymerase (Firma Roche) gegeben.

Das Amplifikationsprotokoll ist auf der folgenden Seite in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Auflistung der Einzelschritte der PCR-Reaktion

Schritt	Temperatur °C	Zeitspanne
1.	94	5 min
2.	94	0,20 min
3.	61	1 min
4.	72	1 min
5.	94	0,20 min
6.	58	1 min
7.	72	1 min
8. *	94	0,20 min
9. *	55	1 min
10. *	72	1 min
11.	72	5 min

*Die Schritte 8.-11. wurden jeweils 30-mal aufeinander folgend wiederholt.

5.3.4 Herstellung von Agarosegelen für den Nachweis der PCR-Produkte

Für den Nachweis der Amplifikate aus der PCR-Reaktion wurden Agarosegele verwendet. Gelöste Agarose (Polysaccharid aus D-3,6-Anhydrogalaktose und L-Galaktose) ist neutral und bildet nach der Aushärtung ein Gitternetz aus, das als Trennmatrix für DNA-Moleküle verwendet werden kann. Die Konzentration der Agarose variiert, je nach der Größe der DNA-Moleküle, die getrennt werden sollen. Hier wurde ein 2%iges Gel hergestellt. Dafür wurden in einem Kolben 6 g Agarose in 300 ml Auftrennpuffer gelöst. Bei max. 900 W in der Mikrowelle wurde das Gemisch für 5 min zum Kochen gebracht und anschließend für 10 min bei 180 W weiter erhitzt. Danach wurde die Lösung kurz durchgeschwenkt und mit 100 µl Ethidiumbromid (100 µg/ml) versetzt. Die gelöste Agarose musste mit dem Ethidiumbromid durch mehrmaliges Schwenken gut vermischt werden. Die Zugabe von Ethidiumbromid ist essentiell für die später beschriebene Fotodokumentation der PCR-Amplifikation. Anschließend konnte die Lösung in den vorher mit Tesafilm (Klebeband) abgeklebten Gelträger eingefüllt werden. Dann wurden die

Probenauftragskämme (Abstandhalter für DNA-Proben) eingesetzt und das Gel für 1 Stunde bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Nach dem vorsichtigen Entfernen der Kämme und der Tesafilmstreifen war das Gel gebrauchsfertig.

5.3.5 Herstellung von Agarosegelen für die Auftrennung von PCR-RFLP Produkten

Zur Auftrennung der RFLP-Produkte wurde die Meta Phor Agarose verwendet.

Die Meta Phor Agarose zeichnet sich im Gegensatz zur konventionellen Agarose durch ausgezeichnete Trenneigenschaften (bis auf 2 Basenpaare genau) aus. Diese Eigenschaft wurde für die Auftrennung der RFLP-Produkte genutzt.

Für die Herstellung des Gels wurden 8 g Meta Phor Agarose in 200 ml Auftrennpuffer gelöst (4%iges Gel) und 15 min lang suspendiert. In der Mikrowelle wurde die Lösung bei 300 W für 2 min erhitzt und anschließend bei 900 W nochmals 2 min aufgekocht. Nach dem Durchschwenken wurden 100 µl Ethidiumbromid (Verdünnung 1:100) dazugegeben und die Lösung gut gemischt. Dann konnte sie in die vorher mit Tesafilm abgeklebte Gelkammer gegossen werden und die Probenverteilungskämme eingesetzt werden. Das Gel wurde 1 h auspolymerisiert. Zuletzt wurden Kämme und Tesafilm entfernt.

5.3.6 Elektrophorese der PCR-Produkte

Das Prinzip des Verfahrens besteht darin, dass DNA-Moleküle in einem Trennmedium (2%ige Agarose) auf Grund ihrer Ladungseigenschaften in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden können. DNA-Moleküle sind durch die Anwesenheit von Phosphatgruppen negativ geladen und wandern bei dem pH-Wert von 8-8,4 des Laufpuffers im elektrischen Feld zur Kathode. Durch die Gitternetzstruktur des 2%igen Agarosegels wurden die DNA-Moleküle bei ihrer Wanderung zur Kathode in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt. Kleinere DNA-Moleküle wandern schneller als größere DNA-Moleküle. Das Ethidiumbromid kann bei der Elektrophorese in die DNA interkalieren und markiert die DNA-Moleküle im Agarosegel, wenn sie anschließend mit UV-Licht von 366 nm bestrahlt werden. Die Arbeitsschritte für die Gelelektrophorese gliederten sich folgendermaßen:

Zuerst musste die Elektrophoresekammer mit 1,5 l gebrauchsfertigem Laufpuffer gefüllt werden. Dazu wurde die 10fach konzentrierte Stammlösung des Elektrophoresepuffers (bestehend aus Tris 109,0 g + Borsäure 54,4 g + EDTA 3,7 g add 1 l Aqua dest) im Verhältnis 1:10 verdünnt. Der Puffer konnte für 5-6 Trennungen verwendet werden. Dann wurde das Agarosegel (Herstellung siehe Pkt. 5.3.4) in die Elektrophoreseeinrichtung gelegt. Nun wurden jeweils 5 µl der Proben in die Vertiefungen pipettiert und in die Kontrollspur 5 µl eines phi x 174-Hae III Längenstandard hineinpipettiert. Der Längenstandard wurde zur Identifizierung der PCR-Produkte mitgeführt und zeichnete sich durch folgende Fragmente aus: 1353 bp, 1070 bp, 872 bp, 603 bp, 310 bp, 281 bp, 271 bp, 194 bp, 118 bp, 72 bp. Die PCR-Produkte wurden bei einer angelegten Spannung von 256 V für 20 min bei Raumtemperatur getrennt.

Anschließend wurde das Gel entnommen und zur Dokumentation abfotografiert.

5.3.7 Fotografieren von Gelen

Für die Dokumentation der Ergebnisse wurde die Tatsache ausgenutzt, dass der fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid aus dem Agarosegel bei der Elektrophorese in die DNA eingebaut wird. Durch UV-Bestrahlung wird das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid sichtbar.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer genommen und zentriert auf den Leuchttisch der Fotoeinrichtung gelegt. Bei Blende 8, einer Belichtungszeit von 1 Sekunde und einem Abstand des Fotos zum Beleuchtungstisch von 59,57 cm wurde eine Polaroidaufnahme angefertigt. Die Entwicklungszeit der Fotos dauerte 1 Minute. Damit war der Dokumentationsschritt abgeschlossen.

5.3.8 RFLP (Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen) Analyse

Um nachzuweisen, ob die PCR-Produkte für Exon A die Punktmutation an Position 77 tragen, wurde als Testverfahren die RFLP-Analyse eingesetzt. Als Restriktionsenzym wurde *Msp I* verwendet. Dieses Enzym erkennt die Sequenz CCGG, die zusätzlich im PCR-Produkt vorhanden ist, wenn die Punktmutation präsent ist. Somit lässt sich dieses Enzym nutzen, um zwischen der Wildtypsequenz

und der mutierten Sequenz zu differenzieren. Beim Vorliegen der mutierten Sequenz wird für das Restriktionsenzym eine zusätzliche Spaltstelle generiert.

Die eingesetzte PCR-RFLP-Analyse untergliedert sich in die folgenden vier Schritte:

1. Vervielfältigung von Exon A des CD45 Gens

(Beschreibung siehe Punkt 6.3.2)

2. Ausfällung der PCR-Produkte

- * Für die RFLP-Analyse wurden 30 µl PCR-Produkt mit 3 µl Natrium-Acetatlösung (3 molar, pH 5,2) und 75 µl 96 % Ethanol versetzt und die DNA über Nacht bei -34° C gefällt.
- * Am nächsten Tag wurde die ausgefällte DNA bei 13.000 U/min für 15 min zentrifugiert und dann der Überstand abgenommen. Ein Waschvorgang mit 200µl 80 % Ethanol und anschließender 15 min Zentrifugation bei 13.000 U/min schloss sich an. Danach wurde die gefällte DNA für mindestens 30 min bei Raumtemperatur getrocknet.

3. Verdau durch Restriktionsenzym *Msp I*

- * Die getrocknete DNA wurde in 1 µl (10 U) *Msp I* Restriktionsendonuklease, 1 µl L-Puffer (Tris-HCl 10 mmol/l + MgCl₂ 10 mmol/l + Dithiotreitol 1 mmol/l, pH 7,5) und 8 µl Aqua dest. aufgenommen. Dieser Ansatz wurde 4 h (bei 37° C, 650 U/min) auf dem Schüttler inkubiert. Abschließend wurde ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 3.000 U/min angeschlossen.

4. Gelelektrophorese und Fotodokumentation.

- * Für die Elektrophorese wurden von diesem RFLP-Produkt 10 µl mit 2,5 µl Auftragspuffer versetzt und in die Probenvertiefungen des Meta-Phor-Agarose-Gels (Herstellung siehe Punkt 6.3.4) pipettiert. Neben jede Probe mit *Msp I*-Verdauungsprodukt wurde zur besseren Veranschaulichung je 5 µl der dazugehörigen Probe des unverdauten PCR-Produktes pipettiert. Die Proben wurden für 40 min bei 256 V elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde das Gel zu Dokumentationszwecken abfotografiert (siehe 5.3.7) und ausgewertet.

5.4 Statistik

Für die statistischen Auswertungen wurde der doppelseitige Fisher-Exakt-Test zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen auf Signifikanz verwendet, da die angenommene Wahrscheinlichkeit für die Punktmutation unter 5 % lag. Der Test stellt eine Abwandlung des Chi-Quadrat-Tests dar.

Hiermit wurde die Hypothese überprüft, ob eine Assoziation zwischen der Punktmutation und der Erkrankung M. Crohn im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv oder aber zwischen der Erkrankung C. ulcerosa und einem Kontrollkollektiv besteht.

Ebenso wurde die Hypothese überprüft, ob die Punktmutation mit M. Crohn oder C. ulcerosa assoziiert ist, wenn die beiden CED miteinander verglichen werden.

Ein p-Wert unter 0,05 gilt als signifikant.

6 Ergebnisse

6.1 Durchflusszytometrische Analyse

6.1.1 Durchflusszytometrische Darstellung der Leukozytenpopulationen

In der Arbeit wurde mit durchflusszytometrischen Untersuchungen das CD45 Expressionsmuster von Lymphozyten analysiert. Um die Lymphozytenpopulation im Durchflusszytometer zu erfassen, wurden die zu untersuchenden Blutproben in einem Zweiparameter-Punktehistogramm (dot plot) dargestellt. Hier ist auf der x-Achse das Vorwärtstreulicht (FSC-H) aufgetragen, welches ein Maß für die Zellgröße ist, während auf der y-Achse das Seitenstreulicht (SSC-H) dargestellt ist, das die Zellgranularität definiert.

In Abbildung 3 wurde eine repräsentative Analyse gezeigt. Es ist zu erkennen, dass durch die Zellgröße und die Zellgranularität 3 verschiedene Zellpopulationen identifiziert werden können. In Abbildung 3 wurden diese mit Ziffern gekennzeichnet, wobei die Lymphozyten mit 1, die Monozyten mit 2, die Granulozyten mit 3 markiert sind. Die 4 kennzeichnet Zelltrümmer. Da für die Arbeit nur die Lymphozyten interessierten, wurde um diese Population ein Analysefenster (engl.: gate) gelegt. Dadurch war für alle untersuchten (n = 383) Blutproben die separate Analyse der Lymphozyten mit ihrem zugehörigen CD45 Expressionsmuster möglich.

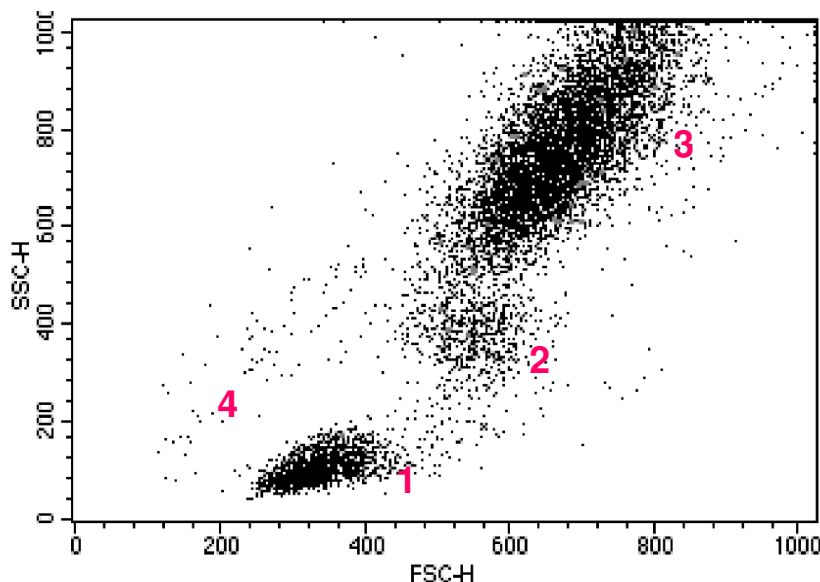


Abb. 3: Darstellung der Zellpopulationen einer durchflusszytometrischen Messung als dot plot;

Die X-Achse stellt die Zellgröße dar (FSC-H), die Y-Achse zeigt die Granularität (SSC-H).

Es wurden 10.000 Signale analysiert.

Die Ziffer 1 markiert Lymphozyten, Ziffer 2: Monozyten, Ziffer 3: Granulozyten, Ziffer 4: Zelltrümmer

6.1.2 Ergebnisse der Titration der CD45 Antikörper

In der Arbeit wurden die Lymphozyten mit verschiedenen CD45 Antikörpern angefärbt. Damit das Verfahren der Anfärbung bei ökonomischer Verwendung der Antikörper zu verwertbaren Ergebnissen führt, mussten für die jeweiligen Antikörper die optimalen Konzentrationen gefunden werden, bei der sämtliche Antigenbindungsstellen durch den Antikörper abgesättigt worden sind. Diese Voraussetzung ist erreicht, wenn die Antikörperkonzentration im Vergleich zu den entsprechenden Antigenbindungsstellen im Überschuss vorliegt. Um die optimale Antikörperkonzentration zu finden, wurden die Antikörper titriert und die erhaltenen Histogramme überlagert und verglichen.

In der Abbildung 4 Bild A (siehe Seite 48) sind die überlagerten Histogramme beispielhaft für den CD45RA Antikörper dargestellt. Die Lymphozyten wurden mit den Antikörpern in den Stufen unverdünnt, 1:10 und 1:100 angefärbt. Das rote Histogramm mit der Antikörperverdünnungsstufe 1:10 und das blaue Histogramm mit dem unverdünnten Antikörper ergeben in der Überlagerung Deckungsgleichheit. Dieses Resultat weist darauf hin, dass beide Antikörperkonzentrationen im gleichen Maße die Antigenbindungsstellen absättigen. Aus diesem Grund reicht eine Antikörperkonzentration von 1:10 aus, um optimal auswertbare Ergebnisse zu erzielen.

Bei einer Antikörperkonzentration von 1:100 (grüne Linie) ist das nicht der Fall, denn das entsprechende Histogramm ist im Vergleich zu anderen Histogrammen nach links verschoben, wodurch eine unzureichende Absättigung der Antigenbindungsstellen angezeigt wird.

Mit dem gleichen Verfahren wurde die ökonomisch optimale Konzentration für den CD45R0 Antikörper ermittelt. Die überlagerten Histogramme sind in der Abbildung 4 Bild B dargestellt. Hier ergab sich, dass mit einer Antikörperkonzentration von 1:10 die erforderlichen Bedingungen für optimal verwertbare Ergebnisse erzielt werden.

In ähnlicher Art und Weise wurde die notwendige Antikörperkonzentration für den Sekundärantikörper Anti-Ratte IgG2b bestimmt. Dieser Sekundärantikörper wurde für den Nachweis des CD45RC Antikörpers verwendet. Die Lymphozyten wurden mit dem Sekundärantikörper in den Verdünnungsstufen unverdünnt, 1:10 und 1:100 angefärbt und die erhaltenen Histogramme überlagert. Die Abbildung 4 Bild C zeigt das Ergebnis. Es ist zu erkennen, dass das schwarze Histogramm (Lymphozyten

ohne Antikörper, Negativkontrolle) und das rote Histogramm (Stufe 1:100) deckungsgleich sind, während das blaue Histogramm (Stufe 1:10) im Vergleich zu den anderen Histogrammen nach rechts verschoben ist. Da auf humanen Lymphozyten keine Antigenbindungsstellen für einen Anti-Ratte IgG2b Antikörper vorhanden sind, kann dieser Antikörper nicht spezifisch an den Lymphozyten binden. Tritt trotzdem eine Bindung auf, so ist diese unspezifischer Natur und wird meistens durch einen hohen Antikörperüberschuss verursacht.

Dieser Zustand wird in Abbildung 4 Bild C durch das blaue Histogramm repräsentiert, denn bei dieser Antikörperkonzentration ist eine Bindung nachweisbar, weil das Histogramm im Vergleich zur Negativkontrolle im positiven Bereich liegt. Im Gegensatz dazu ist das Histogramm bei einer Antikörperkonzentration von 1:100 deckungsgleich mit dem Histogramm der Negativkontrolle. Bei dieser Antikörperkonzentration sind deshalb störende unspezifische Bindungen des Antikörpers ausgeschlossen. Damit die Verdünnungsstufe verwendet werden konnte, musste zuvor sichergestellt werden, dass sie ausreicht, um den gebundenen CD45RC Antikörper auf den Lymphozyten in ausreichendem Maße nachzuweisen. Dieses war bei der Verdünnung 1:100 gegeben. Darum wurde diese Verdünnung des Sekundärantikörpers für alle nachfolgenden durchflusszytometrischen Analysen verwendet.

Für den CD45RC Antikörper wurden genauso wie für den CD45RA und CD45RO Antikörper Titrationsreihen erarbeitet. Hierbei ergab sich, dass der CD45RC Antikörper in unverdünnter Form eingesetzt werden musste.

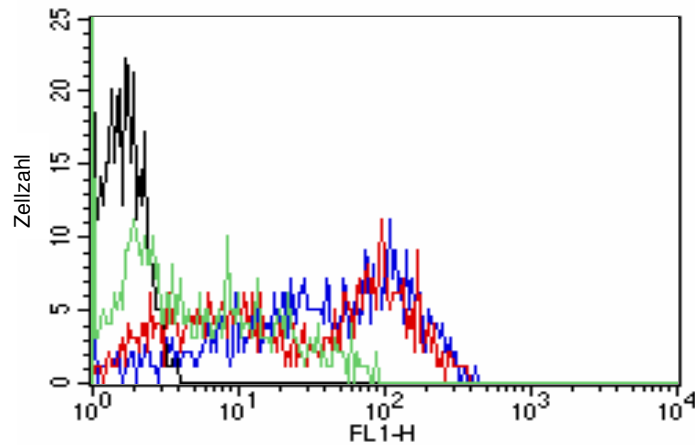


Bild A

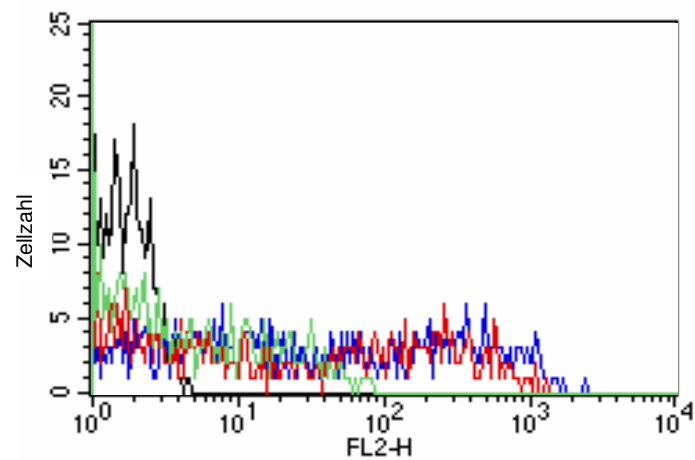


Bild B

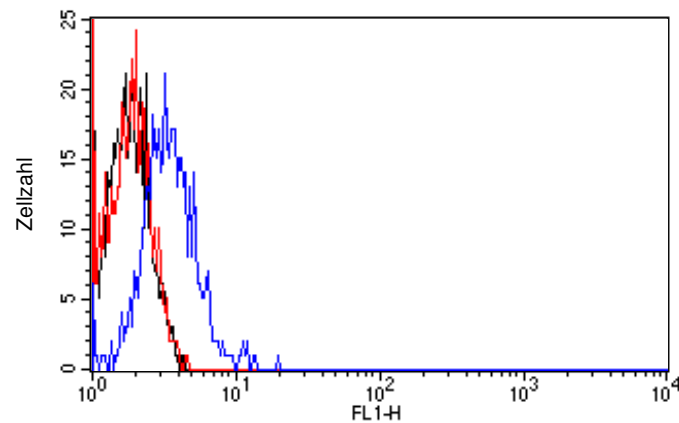


Bild C

Abb. 4: Darstellung der Histogramme nach Titration der Antikörper.

Die Abb. stellen die Analysen der Lymphozytenpopulation dar. In den **Bildern A, B, C** zeigen die schwarzen Linien immer den Ansatz ohne Antikörper (Negativkontrolle). Die Fluoreszenzintensitäten für die einzelnen Antikörper sind auf der x-Achse angegeben. Die y-Achse beschreibt jeweils die Zellzahl. **Bild A** zeigt die mit 20 µl des CD45RA Antikörpers (MEM 56) angefärbten Lymphozyten: unverdünnt (blaue Linie), 1:10 (rote Linie), 1:100 (grüne Linie)

Bild B stellt die Anfärbung der Lymphozyten mit 20 µl des CD45R0 Antikörpers (UCHL 1) in gleichen Verdünnungsstufen w.o. dar.

Im **Bild C** wurde die Anfärbung der Lymphozyten mit 10 µl eines Anti-Ratte-Antikörpers gezeigt, wobei die blaue Linie für die Verdünnungsstufe (1:10) und die rote Linie für die Verdünnungsstufen (1:100) steht.

Die Ergebnisse der Titrationsexperimente mit den einzelnen Antikörpern sind in Tabelle 5 detailliert zusammengefasst.

Tabelle 5: optimale Verdünnungsansätze

Antikörper	Optimale Verdünnung	Eingesetzte Menge pro Ansatz
CD45RA	1:10	20 µl
CD45R0	1:10	20 µl
CD45RC	unverdünnt	20 µl
Sek. AK	1:100	10 µl

Bei allen nachfolgenden durchflusszytometrischen Analysen dieser Arbeit kamen die in Tabelle 5 aufgelisteten Volumina und Verdünnungstufen mit den jeweiligen Antikörpern bei den Färbeansätzen zum Einsatz.

6.1.3 Isotypkontrollen für die ausgewählten CD45 Antikörper

Nachdem die Konzentrationen der CD45 Antikörper zum Anfärben der Lymphozyten für die durchflusszytometrischen Analysen festlagen, musste überprüft werden, ob bei diesen Konzentrationen die Antikörper auf Grund ihres Isotyps unspezifisch an humane Lymphozyten binden.

Der CD45RA Antikörper hatte den Isotyp Maus IgG2a, der CD45R0 Antikörper hatte den Isotyp Maus IgG2b und der CD45RC Antikörper besaß den Isotyp Ratte IgG2b. Humane Lymphozyten wurden deshalb mit einem Maus IgG2a FITC-Antikörper, Maus IgG2b PE-Antikörper und einem Ratte IgG2b FITC-Antikörper zur Kontrolle der Isotypen angefärbt. Ein besonderes Merkmal der Isotyp-Kontrollantikörper war, dass sie gegen ein Epitop gerichtet sind, welches auf humanen Lymphozyten fehlt. Diese genannten Isotyp-Kontrollantikörper wurden in den gleichen Volumina und Konzentrationen wie die zugehörigen CD45 Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse eingesetzt.

In der Abbildung 5 auf Seite 51 wurden die ermittelten Histogramme dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass bei sämtlichen Ansätzen die jeweiligen Histogramme für die Isotyp-Kontrollantikörper mit der Negativkontrolle deckungsgleich sind. Daraus folgt, dass der Maus IgG2a-Antikörper, der Maus IgG2b-Antikörper und der Ratte IgG2b-Antikörper in den festgelegten Konzentrationen nicht unspezifisch an Lymphozyten binden.

Wenn diese Alternative aufgetreten wäre, hätten die Histogramme gegenüber den Negativkontrollen eine deutliche Rechtsverschiebung zeigen müssen. Dies trifft hier aber nicht zu. Aus diesem Grund sind alle Positivereignisse, die mit den CD45 Antikörpern gemessen wurden, spezifische Bindungen.

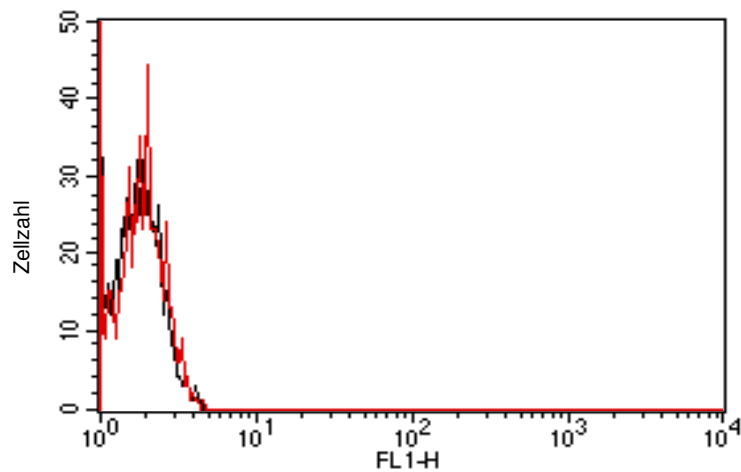


Bild A

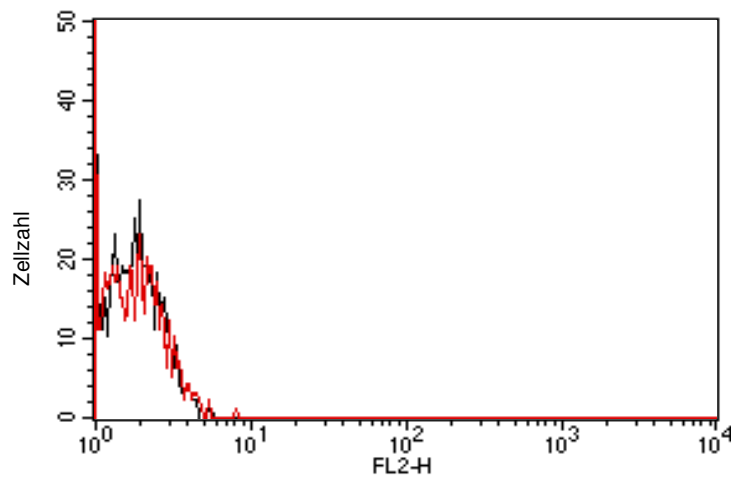


Bild B

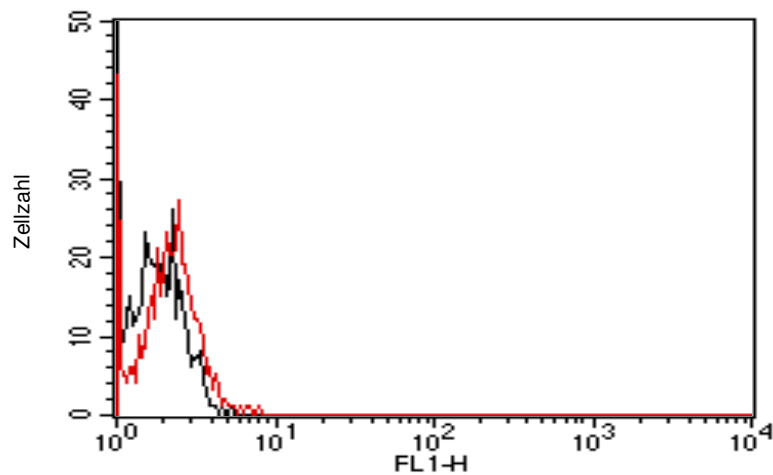


Bild C

Abb.5: Histogramme für Isotypkontrollen der verwendeten CD45 Antikörper

Auf der x-Achse sind die Fluoreszenzintensitäten und auf der Y-Achse die Zellzahlen dargestellt. Die Schwarzen Kurven repräsentieren immer die Negativkontrollen. Jeweils als rote Linie zeigt:

Bild A die Anfärbung der Lymphozyten mit 20 µl Maus IgG2b FITC markiertem Antikörper (1:10) als Isotypkontrolle für CD45RA;

Bild B: mit 20 µl Maus IgG2a PE markiertem Antikörper (1:10) als Isotypkontrolle für CD45R0;

Bild C: mit 20 µl Ratte IgG2b FITC markiertem Antikörper als Isotypkontrolle für CD45RC.

6.1.4 Durchflusszytometrische Analysen

In den folgenden Analysen wurden Lymphozyten von Patienten mit M. Crohn, C. ulcerosa und gesunden Kontrollpersonen auf die CD45RA, CD45R0 und CD45RC Expressionsmuster untersucht. Ziel war, das Auftreten der Frequenz eines varianten Expressionsmusters in den Patientenkollektiven mit der Frequenz des Vorkommens im Kontrollkollektiv zu vergleichen. Hierfür wurden 200 gesunde Kontrollpersonen, 111 Patienten mit Diagnose M. Crohn sowie 72 Patienten mit Diagnose C. ulcerosa untersucht.

Dafür wurden aus ihren Blutproben Lymphozyten gewonnen und diese mit einem CD45RA-FITC markiertem Antikörper in Kombination mit einem CD45R0-PE markiertem Antikörper angefärbt und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

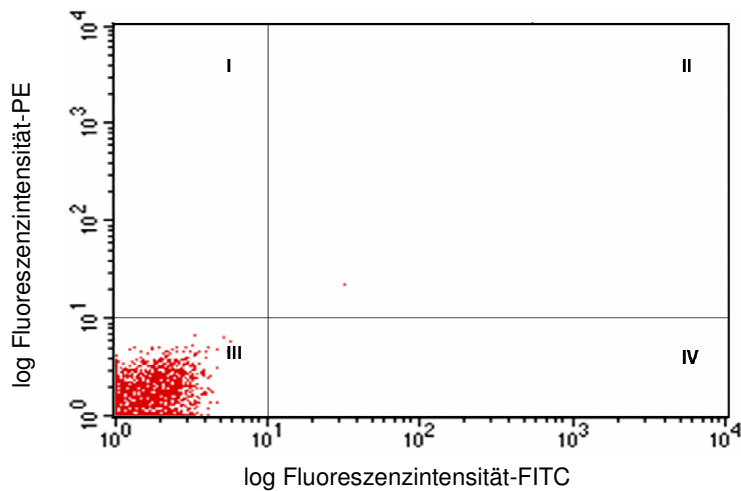
Zusätzlich zu dieser CD45RA/CD45R0 Doppelfluoreszenzanalyse wurde das CD45RC Expressionsmuster der Lymphozyten separat in einer indirekten Einfachfarb-Fluoreszenzanalyse ermittelt.

Ein normales (klassisches) CD45RA/CD45R0 Expressionsmuster mit der zugehörigen prozentualen Quadrantenberechnung ist in Abbildung 6 (Seite 53) dargestellt.

Bild A zeigt eine Lymphozytenpopulation ohne Antikörperfärbung als Negativkontrolle.

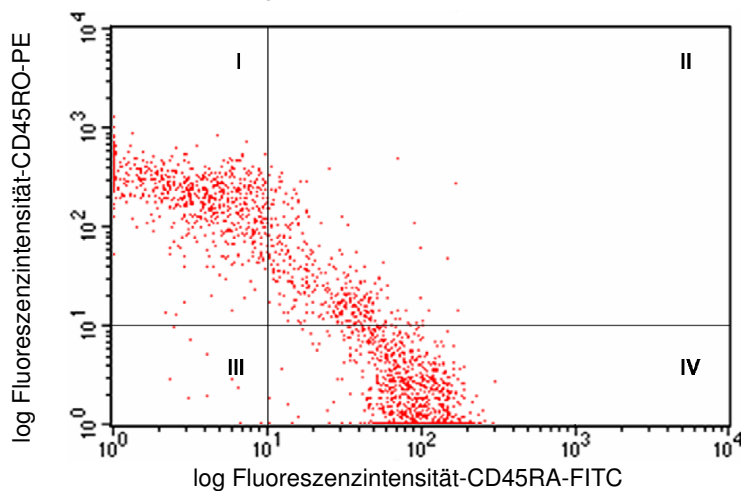
Im Bild B wurde die Darstellung der Doppelfluoreszenzanalyse durch 4 Quadranten unterteilt, wodurch sich folgende Populationen unterscheiden lassen:

CD45RA-/CD45R0+ (Quadrant I),
CD45RA+/CD45R0+ (Quadrant II),
CD45RA-/CD45R0- (Quadrant III)
und CD45RA+/CD45R0- (Quadrant IV).



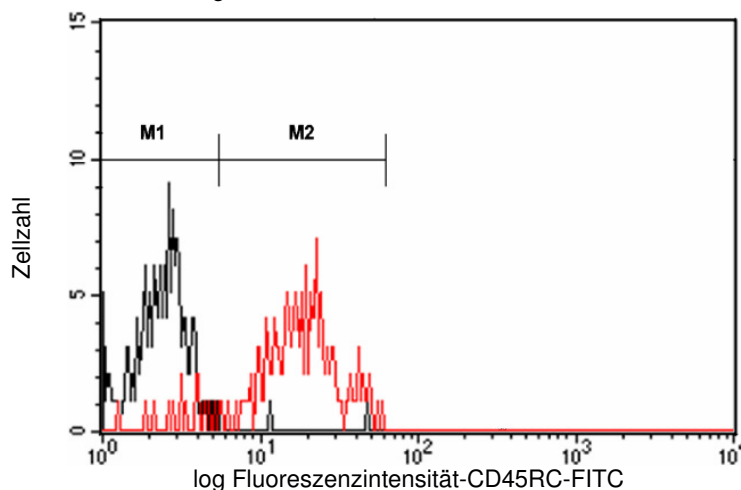
Quadrant	% Verteilung
I	0
II	0,01
III	99,99
IV	0

Bild A



Quadrant	% Verteilung
I	40,76
II	17,61
III	0,72
IV	40,9

Bild B



Marker	% Verteilung
M1 rot	16,3
M2 rot	83,7

Bild C

Abb. 6: Darstellung eines normalen CD45 Expressionsmusters

Römische Ziffern beschreiben die Quadranteneinteilung.

Bild A zeigt eine dot plot Auswertung der Lymphozyten ohne Antikörperfärbung als Negativkontrolle.

Bild B präsentiert die Doppelfluoreszenzanalyse mit dem CD45R0-PE Antikörper (UCHL1) u. dem CD45RA-FITC Antikörper (MEM 56).

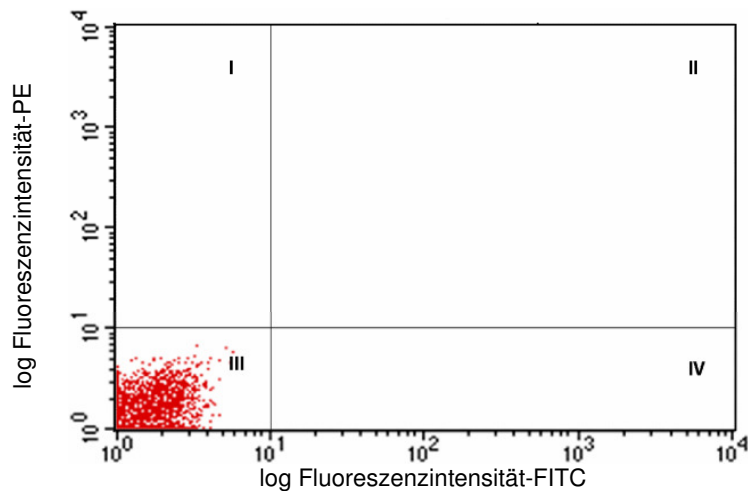
Im **Bild C** ist ein Histogramm für die CD45RC Expression von Lymphozyten dargestellt. Die schwarze Linie zeigt die Negativkontrolle. Die rote Linie des Histogramms zeigt Lymphozyten, die mit dem CD45RC Antikörper (YTH 80.103) in Kombination mit dem Anti-Ratte IgG2b Antikörper (G15-337) angefärbt wurden. Die Marker M1 und M2 unterscheiden CD45RC- und CD45RC+ Lymphozyten.

Da sich die Lymphozytenpopulation zu 80 % aus T-Zellen zusammensetzt, spiegelt die erhaltene Doppelfluoreszenzanalyse größtenteils das Expressionsmuster von T-Zellen wieder. Die CD45RA+/CD45R0- Lymphozytenpopulation markiert größtenteils T-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten. Sie werden als naive T-Zellen deklariert. Im Gegensatz dazu steht die Lymphozytenpopulation mit dem Expressionsmuster CD45RA-/CD45R0+. Sie enthält überwiegend aktivierte T-Zellen die schon Antigenkontakt hatten und als memory T-Zellen klassifiziert werden.

Die Lymphozytenpopulation CD45RA+/CD45R0+ enthält überwiegend T-Zellen, die gerade aktiviert worden sind und zu memory T-Zellen ausdifferenzieren.

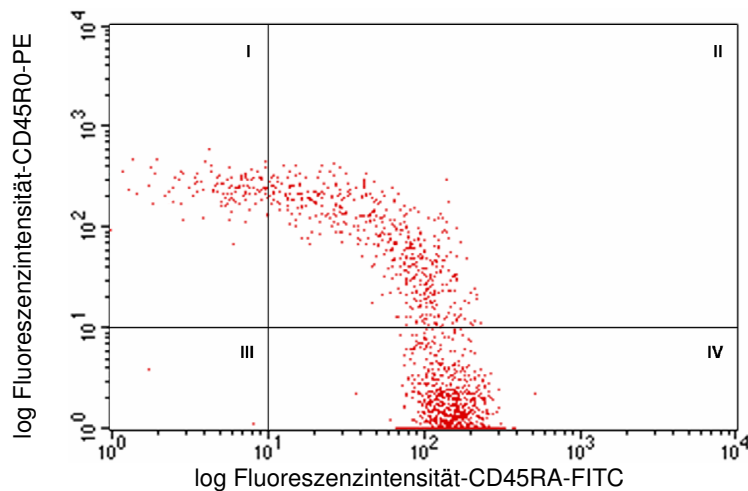
Das Histogramm in Abbildung 6 Bild C auf Seite 53 repräsentiert die CD45RC Expression der Lymphozyten. Es lässt sich eine CD45RC- und eine CD45RC+ Population differenzieren. Durch die Marker M1 und M2 konnte eine Berechnung der durchschnittlichen Verteilung der Zellen erfolgen. Es ergaben sich Durchschnittswerte von 3 % CD45RC- und 97 % CD45RC+ Lymphozyten (siehe dazu auch Abb. 9 auf Seite 58). Aus der Literatur ist bekannt, dass sich in der CD45RC- Population mehrheitlich aktivierte T-Zellen befinden, während die CD45RC+ Lymphozytenfraktion überwiegend aus nichtaktivierten T-Zellen besteht.

Im Gegensatz zum normalen CD45 Expressionsmuster der Lymphozyten zeichnet sich ein variantes CD45 Expressionsmuster durch markante Veränderungen der CD45RA Expression aus. Die Abbildung 7 auf Seite 55 zeigt die Proben einer betroffenen Person mit dem varianten CD45RA Expressionsmuster. Im Vergleich zu einem normalen Expressionsmuster fehlt hier die CD45RA-/CD45R0+ Population der Lymphozyten (im Quadrant I) fast vollständig.



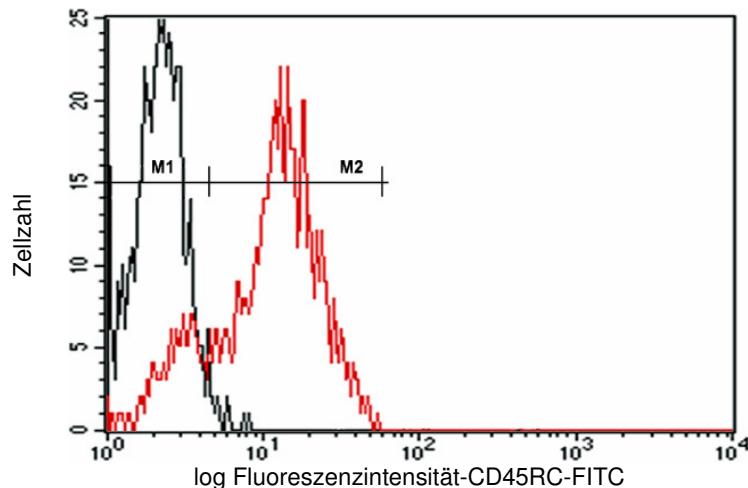
Quadrant	% Verteilung
I	0
II	0
III	100
IV	0

Bild A



Quadrant	% Verteilung
I	4,92
II	16,98
III	7,79
IV	70,30

Bild B



Marker	% Verteilung
M1 rot	11,07
M2 rot	88,93

Bild C

Abb. 7: Darstellung eines varianten CD45 Expressionsmusters

Römische Ziffern beschreiben die Quadranteneinteilung.

Bild A zeigt eine dot plot Auswertung der Lymphozyten ohne Antikörperfärbung als Negativkontrolle.

Bild B zeigt die Doppelfluoreszenzanalyse mit dem CD45R0-PE Antikörper (UCHL1) u. dem CD45RA-FITC Antikörper (MEM 56).

Im **Bild C** ist ein Histogramm für die CD45RC Expression von Lymphozyten dargestellt. Die schwarze Linie zeigt die Negativkontrolle. Die rote Linie des Histogramms zeigt Lymphozyten, die mit dem CD45RC Antikörper (YTH 80.103) in Kombination mit dem Anti-Ratte IgG2b Antikörper (G15-337) angefärbt wurden. Die Marker M1 und M2 unterscheiden CD45RC- und CD45RC+ Lymphozyten.

Diese Charakteristika wurden detailliert betrachtet, indem der prozentuale Anteil der einzelnen Lymphozytenpopulationen (dargestellt in den zugeordneten Tabellen bei den Grafiken) aus allen Doppelfluoreszenzanalysen für normale Expressionsmuster (n = 371) den varianten Expressionsmustern (n = 12) gegenübergestellt wurden. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 8 auf Seite 57 als Balkendiagramme verdeutlicht.

Das variante CD45RA Expressionsmuster wurde bei 200 Kontrollpersonen sechsmal gefunden. Bei 111 Patienten mit M. Crohn wurde es nur einmal gefunden, während es dagegen bei 72 Patienten mit C. ulcerosa fünfmal auftrat.

Die Verteilung des varianten CD45RA Expressionsmusters bei Patienten mit M. Crohn, C. ulcerosa und im Kontrollkollektiv wurde in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Verteilung des CD45 Expressionsmusters der Patienten und der Kontrollpersonen

	Expressionsmuster CD45RA		Expressionsmuster CD45RC
	Variant	Normal	Normal
Patienten mit M. Crohn	1	110	111
Patienten mit C. ulcerosa	5	67	72
Kontrollpersonen	6	194	200
Gesamt	12	371	383

Die Frequenz des Auftretens des varianten CD45RA Expressionsmusters ist somit bei Patienten mit C. ulcerosa deutlich erhöht im Vergleich zu Patienten mit M. Crohn und der Kontrollgruppe. Außerdem ist auffällig, dass die Frequenz des Auftretens des varianten CD45RA Expressionsmusters bei Patienten mit M. Crohn niedriger ist als im Kontrollkollektiv.

Abbildung 8 zeigt, dass bei Personen mit variantem CD45RA Expressionsmuster der Anteil der CD45RA-/CD45R0+ Lymphozytenpopulation bei unter 10 % liegt (lila Balken). Dieser Anteil ist bei Personen mit normalem CD45RA Expressionsmuster mit über 40 % deutlich höher. Dieses Resultat stimmt mit Literaturdaten überein und weist darauf hin, dass bei Personen mit variantem Expressionsmuster der T-Zellen trotz Aktivierung weiterhin die CD45RA Expression erhalten bleibt.

Bei den anderen CD45 Lymphozytenpopulationen gibt es zwischen Personen mit normalem und variantem CD45RA Expressionsmuster keine gravierenden Unterschiede (Abbildung 8).

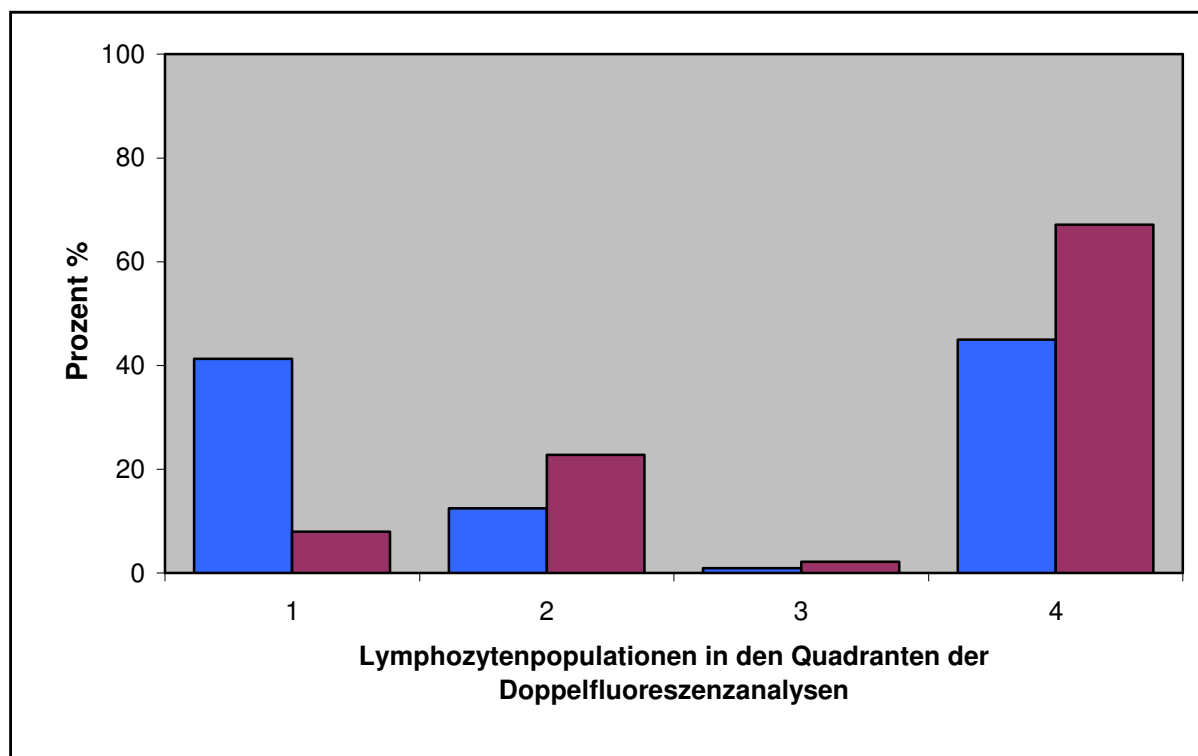


Abb. 8: Prozentuale Verteilungen der Expressionsmuster

Die Säulen zeigt die prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen bei normalem n = 371 (blau) und variantem n = 12 (lila) CD45RA Expressionsmuster auf der x-Achse. Die Säulen 1 entsprechen dem Quadrant I mit der Population CD45RA-/CD45R0+ Die Säulen 2 entsprechen dem Quadrant II mit der Population CD45RA+/CD45R0+ Die Säulen 3 entsprechen dem Quadrant III mit der Population CD45RA-/CD45R0- Die Säulen 4 entsprechen dem Quadrant IV mit der Population CD45RA+/CD45R0- . Die y-Achse gibt die berechnete Durchschnittsverteilung in Prozent an.

Zusätzlich wurde bei allen Personen das CD45RC Expressionsmuster untersucht. Sowohl die Abbildung 6 Bild C als auch die Abbildung 7 Bild C zeigen die gleichen Verteilungsmuster bei Personen mit normalem als auch variantem Expressionsmuster des CD45RA. Mit durchschnittlich 3 % vs. 7 % der Lymphozyten CD45RC- und dementsprechend 97 % vs. 93 % der Lymphozyten CD45RC+ ist die Verteilung in beiden Gruppen homogen.

Für die Untersuchungen mit dem CD45RC Antikörper wurden ebenfalls die Verteilungsverhältnisse in Prozent dargestellt und in Abbildung 9 gezeigt.

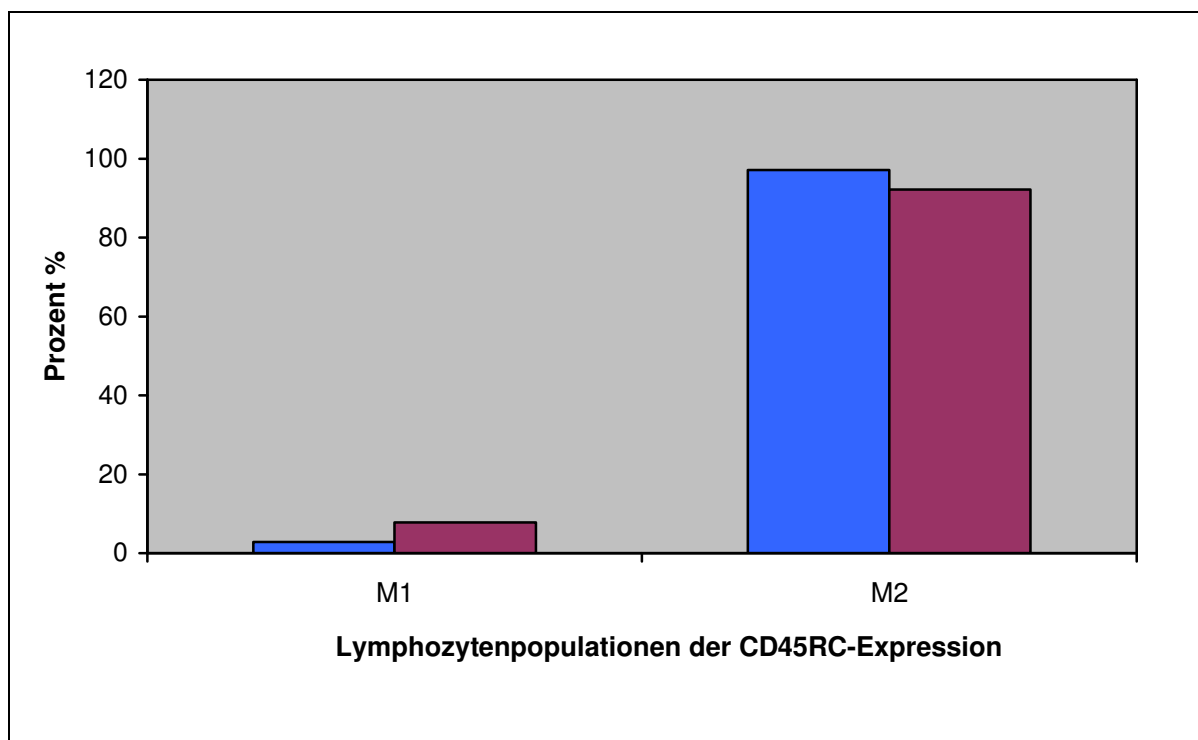


Abb. 9: Die Säulen zeigen für die CD45RC Expression die durchschnittliche prozentuale Verteilung innerhalb der Lymphozytenpopulationen

Blauer Balken - normaler CD45RA Expressionstyp

Lila Balken - varianter CD45RA Expressionstyp

Auf der x-Achse werden die Histogrammauswertungen der Bilder 6 C und 7 C mit den Markern gezeigt. M1 = CD45RC- Zellen M2 = CD45RC+ Zellen.

Auf der Y-Achse stellt sich die errechnete prozentuale Durchschnittsverteilung aller Untersuchungen der CD45RC Zellen dar.

6.2 Molekulargenetische Ergebnisse

6.2.1 Nachweis des PCR-Produktes für Exon A des CD45 Gens

In der Literatur ist beschrieben, dass der variante CD45RA Phänotyp auf einer Punktmutation an Position 77 von Exon A des CD45 Gens beruht. Um zu überprüfen, ob die gefundenen Personen mit variantem CD45RA Expressionsmuster Träger der Punktmutation sind und um sicher zu stellen, dass die Punktmutation bei Personen mit normalem CD45RA Expressionsmuster nicht auftritt, wurde eine PCR-RFLP-Analyse durchgeführt. Alle Blutproben der Studie wurden mit dieser molekulargenetischen Nachweismethode auf die Punktmutation im Exon A des CD45 Gens getestet. Hierfür wurde zunächst das gesamte Exon A amplifiziert und das Amplifikat mit einer Länge von 260 Basenpaaren (bp) mit Hilfe der Gelelektrophorese nachgewiesen. Abbildung 10 zeigt auszugsweise die erfolgreiche Amplifikation des Exon A von 48 unterschiedlichen Personen nach der elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel. Mit dieser Methode wurde für alle (n = 383) Personen das Amplifikat des Exon A des CD45 Gens nachgewiesen.

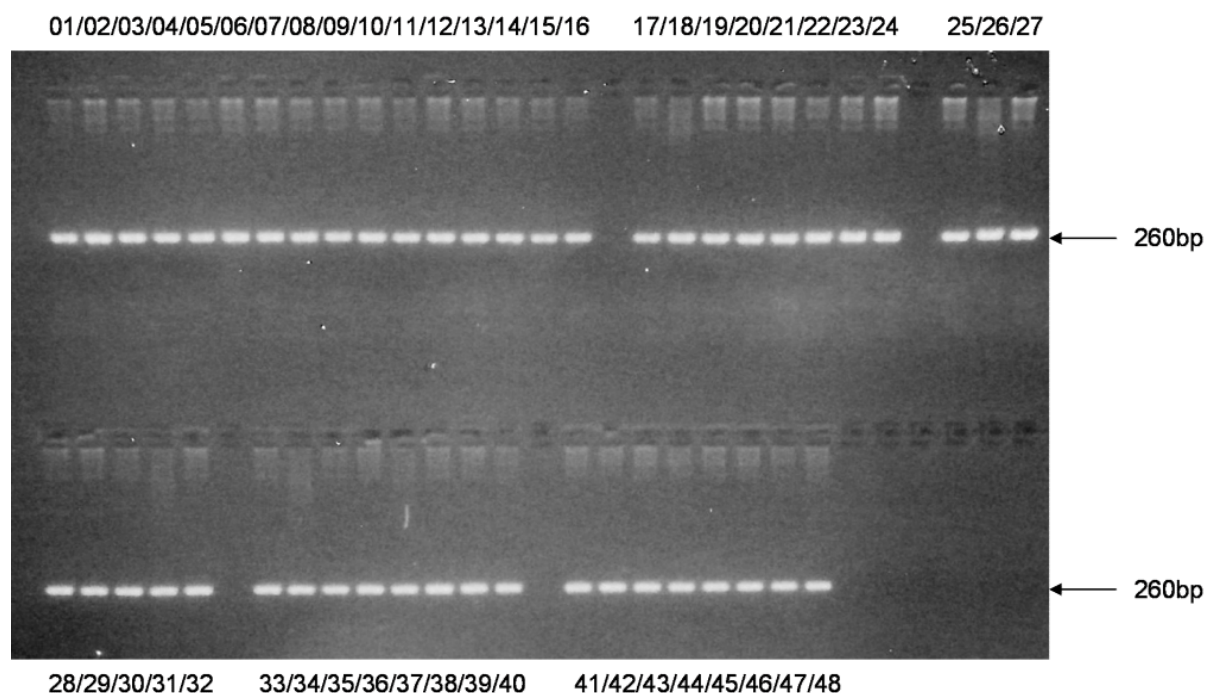


Abb. 10: Darstellung einer Fotografie des PCR-Amplifikates für Exon A des CD45 Gens

Die PCR-Produkte wurden nach der Amplifikation in ein Agarosegel aufgetragen (5µl) und elektrophoretisch aufgetrennt. Es zeigt sich ein einheitliches Amplifikat, dass eine Größe von 260 bp hat. Die Ziffern 1 bis 48 bezeichnen die Probennummern stellvertretend für 383 Untersuchungen. In den Lücken zwischen den Spuren 16/17, 24/25, 32/33 und 40/41 wurden keine Proben aufgetragen, damit die Übersichtlichkeit erhalten blieb.

6.2.2 Nachweis der Punktmutation in der RFLP-Analyse

Zum Nachweis der Punktmutation im Exon A des CD45 Gens wurde das PCR-Amplifikat in einer RFLP-Analyse eingesetzt. Hierfür wurde die DNA des Amplifikats gefällt und anschließend mit dem Restriktionsenzym *Msp* I verdaut. Dieses Enzym erkennt das Sequenzmotiv CCGG und spaltet diesen Sequenzabschnitt spezifisch. Die entstehenden Fragmentlängen der Wildtypsequenz und der mutierten Sequenz wurden in Abbildung 11 schematisiert skizziert.

Das Amplifikat des Wildtyps enthält einmal das Sequenzmotiv CCGG, sodass nach der Behandlung mit dem Enzym *Msp* I zwei Fragmente mit einer Länge von 62 bp und 198 bp entstanden. Beim Amplifikat mit mutierter Sequenz wurde durch die Punktmutation an Position 77 die Wildsequenz CCGG in CCGG modifiziert, sodass eine zusätzliche Schnittstelle für *Msp* I entstand. Dadurch wurde das größere Fragment mit 198 bp in zwei weitere Fragmente mit Längen von 84 bp und 114 bp gespalten. Das obligat auftretende Fragment mit 62 bp diente als Kontrollfragment, um die Funktionstüchtigkeit für die RFLP-Analyse zu dokumentieren. Mit dieser Analysetechnik wurden die Amplifikate aller 383 Proben untersucht.

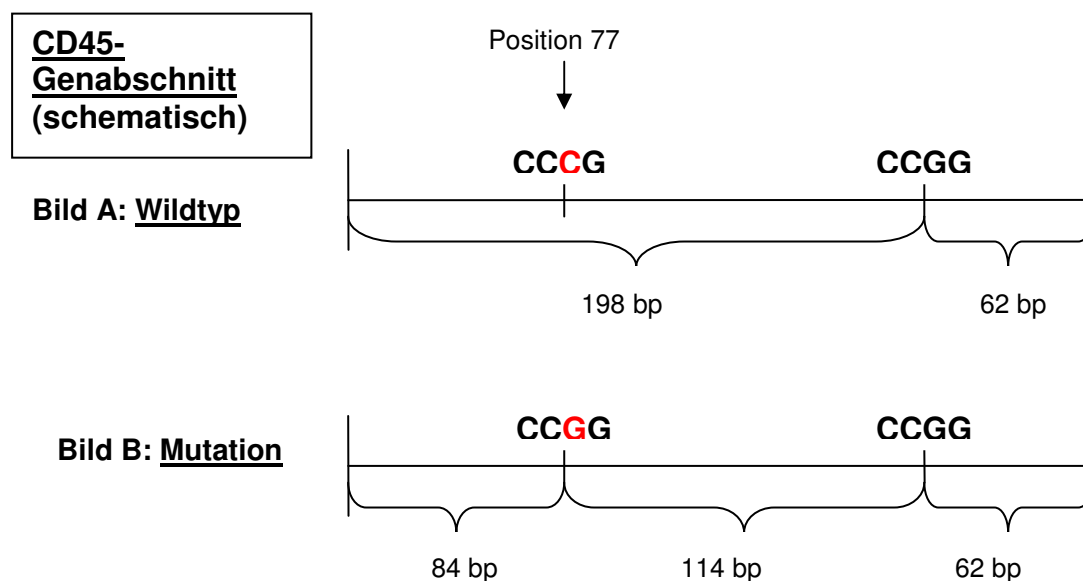


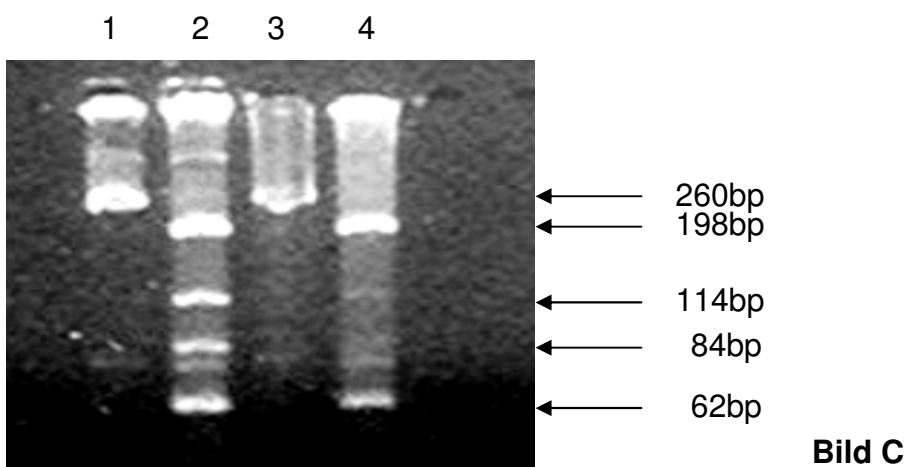
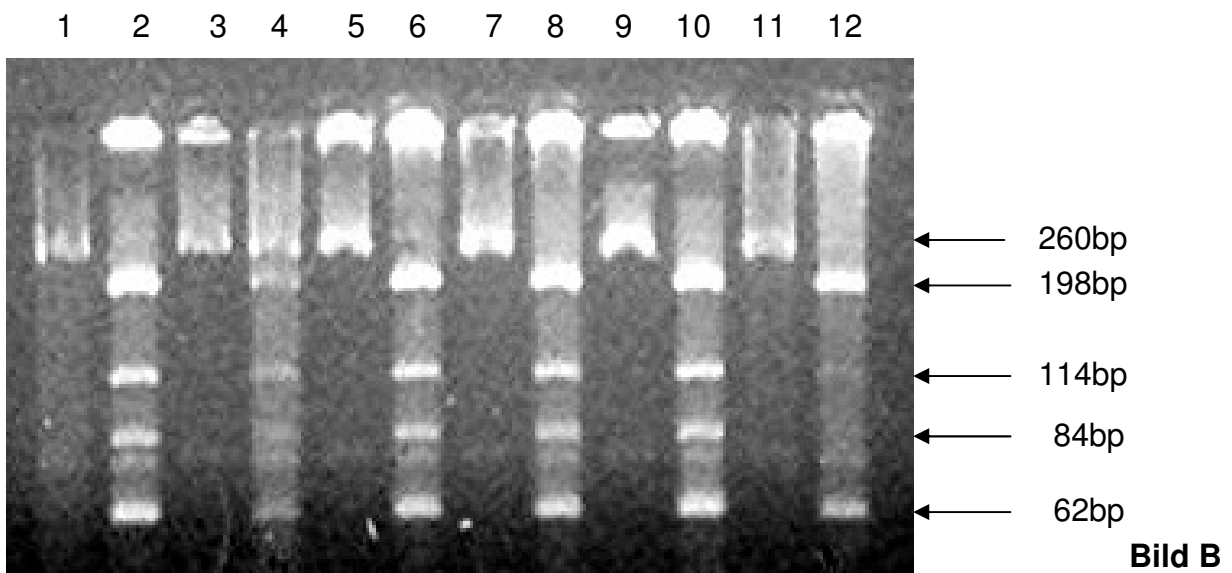
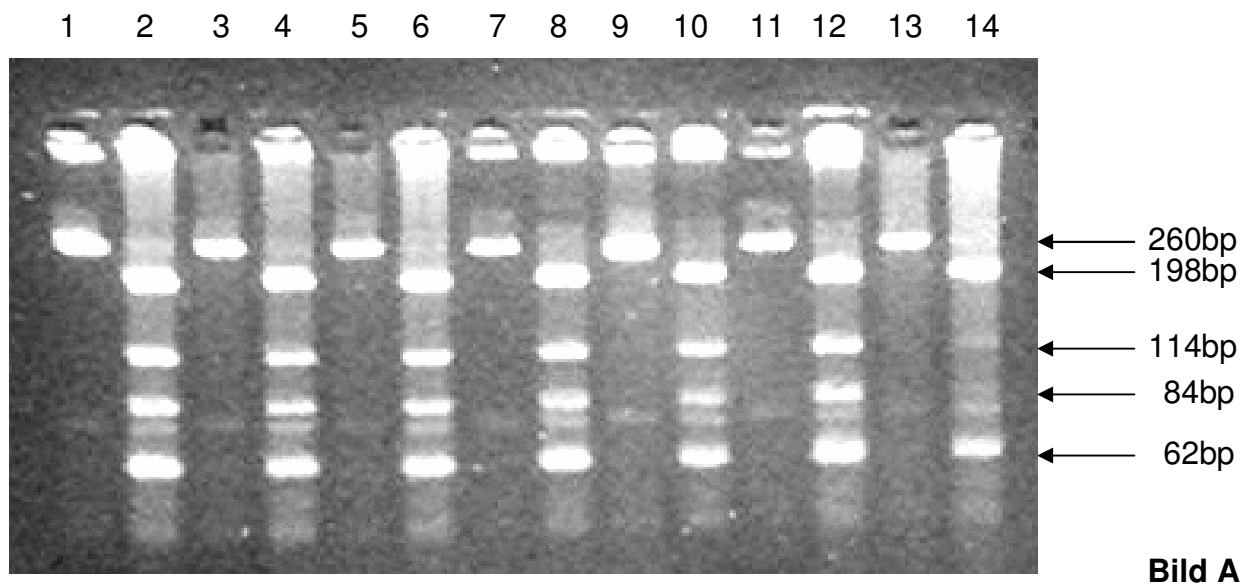
Abb. 11: Fragmentlängenmuster bei Wildtyp- und mutierter Sequenz nach *Msp* I Verdau

Das Amplifikat für Exon A ist 260 bp lang. Bei der Wildtypsequenz wird es durch *Msp* I in zwei Fragmente mit 62 bp und 198 bp gespalten (**Bild A**). Durch die Mutation an Position 77 steht ein G für ein C und somit generierte eine zusätzliche Schnittstelle, sodass drei Fragmente mit Längen von 62 bp, 84 bp und 114 bp entstehen (**Bild B**).

In Abbildung 12 (auf Seite 62) sind in den Bildern A, B und C repräsentative Schlüsselergebnisse der PCR-RFLP-Analyse zusammengefasst dargestellt.

Innerhalb des Kontrollkollektivs wurden 6 Personen mit variantem CD45RA Expressionsmuster gefunden. Bild A zeigt die PCR-RFLP-Analysen von diesen Proben in den Spuren 2, 4, 6, 8, 10 und 12. In den dazwischen liegenden ungeraden Spuren (1, 3, 5, 7, 9 und 11) sind die zugehörigen unverdauten Amplifikate für Exon A abgebildet. Zum Vergleich wurde eine Wildtypprobe mit normalem CD45RA Expressionsmuster in den Spuren 13 (unverdautes Amplifikat für Exon A) und 14 (nach *Msp* I Verdau) aufgetragen. Alle Kontrollindividuen mit variantem CD45RA Expressionsmuster zeichnen sich durch ein Wildtypfragment von 198 bp und durch mutierte Fragmente von 84 bp und 114 bp aus. Diese mutationsspezifischen Fragmente fehlen bei Individuen mit normalem CD45 Expressionsmuster. Das parallele Auftreten von mutationspezifischen Fragmenten und Wildtypfragmenten bei Personen mit variantem CD45 Expressionsmuster zeigt an, dass alle Kontrollindividuen mit variantem CD45 Expressionsmuster die Punktmutation im Exon A in heterozygoter Form tragen. Bei Patienten mit *C. ulcerosa* konnten fünf Personen mit variantem Expressionsmuster identifiziert werden. Die PCR-RFLP-Analysen für diese Patienten wurden in Abbildung 12 Bild B (Spuren 2, 4, 6, 8, 10) dargestellt. Aus den Analysen lässt sich entnehmen, dass die Patienten die Punktmutation ebenfalls in heterozygoter Form tragen. Im Kollektiv der Patienten mit *M. Crohn* wurde ein Patient mit variantem CD45 Expressionsmuster gefunden. Auch diese Person besitzt die Mutation in heterozygoter Form (Abb. 12 Bild C, Spur 2).

Zusammenfassend ergibt sich, dass unabhängig vom Kollektiv alle Personen mit dem varianten CD45RA Expressionsmuster die Punktmutation im Exon A des CD45 Gens in heterozygoter Form besitzen. Ein homozygoter Träger der Punktmutation wurde nicht gefunden, da keine Probe ausschließlich mutationsspezifische Fragmente besaß. Die drei willkürlich ausgewählten Vergleichsproben mit normalem CD45 Expressionsmuster zu jedem Bild (jeweils letzte beiden Spuren) der RFLP-Analyse waren negativ für die Punktmutation im Exon A. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei allen 371 Personen mit normalem CD45 Expressionsmuster. Somit trat die Punktmutation nur bei Personen mit dem varianten CD45RA Expressionsmuster auf, während sie bei Personen mit normalem Expressionsmuster nicht nachgewiesen wurde.



(Abb. 12: Erläuterungen siehe nächste Seite)

Abb. 12: Fotodokumentation der PCR-RFLP-Analysen zum Nachweis der Punktmutation im Exon A des CD45 Gens (siehe 58)

Bild A: zeigt in den Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11 jeweils unverdaute PCR-Amplifikate von gesunden Kontrollpersonen mit **variantem** CD45 Expressionsmuster. Die zugehörigen Fragmente nach *Msp* / Verdau sind in den Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12 aufgetragen. In Spur 13 ist ein unverdautes und in Spur 14 ein verdautes Amplifikat einer Kontrollperson mit **normalem** CD45RA Expressionsmuster dargestellt.

Bild B: präsentiert in den Spuren 1, 3, 5, 7, 9 wie oben jeweils unverdaute PCR-Amplifikate von Personen mit **variantem** CD45RA Expressionsmuster aus der Patientengruppe C. ulcerosa. Dazu gehören die Fragmente nach *Msp* / Verdau in den Spuren 2, 4, 6, 8, 10. Die Spur 11 zeigt ein unverdautes, die Spur 12 ein Amplifikat nach Verdau von einer Person mit **normalem** CD45RA Expressionsmuster aus der Gruppe der Patienten mit C. ulcerosa.

Bild C: hier wurde in Spur 1 das unverdaute und in Spur 2 das *Msp* / verdaute Amplifikat der Person mit **variantem** CD45RA Expressionsmuster aus dem Patientenkollektiv mit M. Crohn aufgetragen. Das Amplifikat eines Patienten dieser Gruppe mit **normalem** CD45RA Expressionsmuster ist als Vergleich in den Spuren 3 (unverdaut) und 4 (verdaut) dargestellt.

Alle Fragmente wurden in einem 4%igem Meta Phor Agarosegel aufgetrennt. Die Pfeile spezifizieren die Fragmente mit der zugehörigen Größe in Basenpaaren (bp).

6.2.3 Vergleiche der Allelfrequenzen

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass für das CD45 Gen zwei Allelformen existieren. Das Wildtypallel mit einem C an Position 77 von Exon A kodiert für das normale CD45RA Expressionsmuster, während das mutierte Allel mit einem G an Position 77 des Exon A für den varianten CD45RA Expressionsmodus kodiert. Die ermittelten Allelfrequenzen im Patientenkollektiv für M. Crohn bzw. C. ulcerosa und im Kontrollkollektiv sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Verteilung der Exon A Punktmutation C zu G an Position 77 des CD45 Gen

Gruppe	C/G Mutation	CC normal	Total	Allelfrequenz für G
Kontrollpersonen	6 (3,0 %)	194 (97,0 %)	200	1,5 %
Patienten mit M. Crohn	1 (0,9 %)	110 (99,1 %)	111	0,45 %
Patienten mit C. ulcerosa	5 (6,9 %)	67 (93,1 %)	72	3,48 %

Die Allelfrequenzen zeigen, dass die Mutation unabhängig von Kollektiv mit geringer Frequenz auftritt. Aus der Tabelle lässt sich entnehmen, dass die G Allelfrequenz (mutiertes Allel) im Kontrollkollektiv bei 1,5 % liegt, während sie im Patientenkollektiv mit M. Crohn einen Wert von 0,45 % erzielt und für das Patientenkollektiv mit C. ulcerosa einen Wert von 3,48 % erreicht.

Der Wert der G Allelfrequenz aus den Patientenkollektiven mit M. Crohn und C. ulcerosa wurde statistisch mit dem Wert der G Allelfrequenz der Kontrollgruppe mit dem Fisher Exakt Test verglichen.

Hierbei ergaben sich Werte von $p = 0,428$ und $p = 0,167$. Diese p-Werte bedeuten, dass das mutierte G Allel in den Patientengruppen nicht statistisch signifikant häufiger oder seltener auftritt, als im Kontrollkollektiv.

Wird allerdings die G Allelfrequenz mit dem Fisher Exakt Test zwischen den Patientenkollektiven M. Crohn und C. ulcerosa untereinander verglichen, so ergibt sich ein p-Wert von $p = 0,036$.

Dieser Wert ist statistisch signifikant.

Daraus ergibt sich ein relevanter Unterschied in der G Allelfrequenzverteilung zwischen den beiden Patientenkollektiven. Das mutierte G Allel tritt bei Patienten mit C. ulcerosa statistisch signifikant häufiger auf als bei Patienten mit M. Crohn.

Das ist ein Schlüsselergebnis dieser Arbeit.

7 Diskussion

Die Erkrankungen M. Crohn und C. ulcerosa sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Dabei ist M. Crohn durch eine transmurale, häufig granulomatöse Entzündung der Darmschleimhaut mit diskontinuierlichem Befallsmuster gekennzeichnet. Bevorzugt betroffen sind der untere Dünndarm und Dickdarmanteile. Die Erkrankung C. ulcerosa dagegen ist eine auf die Mucosa des Kolons beschränkte CED, die vom Rektum ausgehend das Kolon (bei kontinuierlicher Ausbreitung) teilweise oder vollständig befallen kann. Für beide Erkrankungen ist die genaue Ätiologie noch nicht ausreichend bekannt. Es wird aktuell davon ausgegangen, dass ein Zusammenspiel genetischer Faktoren, immunologischer Faktoren und Umweltfaktoren zur Ausbildung der chronischen Entzündung führt.

Erste Hinweise für eine genetische Prädisposition von CED wurden von Rotter 1994 veröffentlicht. Diese Hypothese wurde aufgegriffen und weiter untermauert (Fiocchi 1998). Für eine grundlegende Bedeutung der genetischen Prädisposition sprechen vor allem die familiäre Häufung, das gehäufte Auftreten in bestimmten Populationen und die Ergebnisse von Zwillings-Untersuchungen. Die erhöhte Prävalenz ist bei M. Crohn besonders ausgeprägt. In Studien an Zwillingen fand sich für die entzündliche Darmerkrankung M. Crohn bei monozygoten Paaren eine Konkordanz von 42-58 %, für die Erkrankung C. ulcerosa 6-17 %. Bei heterozygoten Zwillingen liegt die Konkordanz für M. Crohn bei 4-12 % und für C. ulcerosa bei 0-5 % (Duerr 2003, Lehmann 2003).

Diese und weitere Ergebnisse zeigen zusammengefasst, dass genetische Komponenten für die Erkrankung M. Crohn bisher von größerer Bedeutung sind als für C. ulcerosa (siehe Einleitung).

Durch Mikrosatellitenanalysen konnte gezeigt werden, dass es sich bei beiden um polygene Erkrankungen handelt. Mit Hilfe dieser Analysen wurden bisher 9 Regionen (Inflammatory bowel disease IBD1 – IBD9) identifiziert, welche auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. (Mathew and Lewis 2004, Newman and Siminovitch 2005).

Die Regionen IBD1, IBD4, IBD5 und IBD8 beherbergen Empfänglichkeitsgene für M. Crohn (Hugot et al. 1996, Satsangi et al. 1996a, Cho et al. 1998, Curran et al.

1998, Vermeire et al. 2004, Pierik et al 2005), während die Region IBD2 Empfänglichkeitsgene für *C. ulcerosa* enthält (Satsangi et al. 1996a, Curran et al. 1998, Hampe et al. 1999, Parkes et al. 2000).

Die übrigen Regionen definieren Empfänglichkeitsgene für beide Erkrankungen. Bisher konnten nur für zwei Regionen die betroffenen Gene spezifiziert werden. Ein Gen kodiert für ein zytoplasmatisches Protein (c-terminal caspase recruitment domain 15; CARD15/NOD2), das auf Chromosom 16 liegt und in die Region IBD1 fällt. Die anderen Gene (SLC22A4 und SLC22A3) kodieren für organische Kationentransporter (OCTN1 und OCTN2) und befinden sich in der Region IBD5. Innerhalb dieser organischen Ionentransportgene wurden Mutationen gefunden. Eine C zu T Transversion im Gen SLC22A4 an Position 1672 und eine G zu C Transversion an Position 207 im Gen SLC22A5 (Peltekova et al. 2004, Newman et al. 2005) sind mit der Erkrankung M. Crohn assoziiert.

Bei der G zu C Transversion an Position 207 im Gen für SLC22A5 erhöht sich das Risiko, an M. Crohn zu erkranken, auf das 2,5fache, wenn die Mutation in heterozygoter Form vorliegt bzw. um das 4fache, wenn sie im homozygoten Zustand vorhanden ist. Die funktionellen Veränderungen, die von diesen Mutationen ausgehen, sind bisher weitestgehend unklar. Es wird angenommen, dass durch diese Mutationen vermehrt toxische Substanzen in die Zellen befördert werden und dadurch die Entstehung von M. Crohn begünstigt wird.

Im Gegensatz zu den SLC22A4 und SLC22A5 Genen sind die Untersuchungen beim erstgenannten Gen, dem CARD15/NOD2 Gen weiter fortgeschritten. Für dieses Gen wurden zwei Missensemutationen beschrieben. Der Austausch A zu T an Position 702 und G zu A an Position 908 ist hochsignifikant mit der Erkrankung M. Crohn assoziiert, zeigt aber keine Assoziation zu *C. ulcerosa* (Hugot et al. 2001, Ogura et al. 2001).

Das Risiko, an M. Crohn zu erkranken, steigt um das 2 bis 3fache, wenn die Mutation in heterozygoter Form vorliegt, dagegen um das 20 bis 40fache, wenn sie im homozygotem Zustand präsent ist. (Hampe et al. 2001, Lesage et al. 2002, Vermeire et al. 2002, Cavanaugh et al. 2003). Für dieses Gen konnte ein klarer Bezug zur Pathogenese von M. Crohn erarbeitet werden. Das NOD2-Protein besteht aus 1040 Aminosäuren und wird ausschließlich von Monozyten exprimiert.

Am N-Terminus befinden sich zwei CARD- Motive, die strukturell mit den Todesdomänen des TNF-Rezeptors 1 und des Apoptoserezeptors FAS verwandt sind. Der C-Terminus des Proteins wird durch 10 leucinreiche Motive ausgeprägt, die Bindungsaffinität für bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) besitzen. Aus der Bindung von LPS an NOD2 scheint eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu folgen. Dieser ist notwendig, um Bakterien immunologisch erfolgreich eliminieren zu können. Durch die o.g. Mutation bei Patienten mit M. Crohn könnte NOD2 seine Fähigkeit verlieren, eine NF- κ B-Aktivierung auszulösen, woraus eine mangelhafte Elimination von Bakterien resultieren könnte. Folglich wären dann große Teile des mucosalen Immunsystems andauernd aktiviert, ohne dass aus der Aktivierung eine ausreichend Eliminierung der Bakterien folgt. Genau dieser Zustand wird bei M. Crohn beobachtet (Podolsky 2002, Klein et al. 2004).

In die Region IBD3 fallen die Haupthistokompatibilitätsgene (Satsangi et al. 1996a, Bouma et al. 1997, Stokkers et al. 1999). Von der großen Anzahl der vorhandenen Gene scheinen einige mit entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert zu sein. Allerdings ist das Ausmaß der Assoziation je nach untersuchter Population regional außerordentlich unterschiedlich ausgeprägt. Deshalb ist die Bewertung schwierig, wie die HLA-Gene zu den Suszeptibilitätsgenen gehören.

Für die Region IBD6 wurde das Gen für das ICAM-1 Protein spezifiziert. Innerhalb des Gens konnten Mutationen identifiziert werden, die mit M. Crohn oder *C. ulcerosa* assoziiert sind (Yang 1997, Braun et al. 2001, Low et al. 2004).

Die Region IBD7 erhält eine besondere Bedeutung für diese Arbeit. Sie ist genauso wie das Gen für CD45 auf dem Chromosom 1 lokalisiert (Hall et al. 1988, Duerr et al. 1998) Bisher konnte dieser Region kein Gen zugeordnet werden (Cho et al. 1998).

Andere Studien detektieren auf Chromosom 1 weitere Bereiche, die eine Verbindung zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen haben, ohne dass bisher spezifische Gene identifiziert werden konnten (Orchard et al. 2000).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Punktmutation an Position 77 (C zu G) im Exon A des CD45 Gens bei Patienten mit *C. ulcerosa* im Vergleich zu Patienten mit M. Crohn statistisch signifikant mit höherer Frequenz auftritt. Daraus lässt sich ableiten, dass bei Vorhandensein dieser Punktmutation die Wahrscheinlichkeit steigt, eher an *C. ulcerosa* zu erkranken als an M. Crohn. Dadurch könnte die mutierte Form des CD45 Gens zu den Suszeptibilitätsgenen für *C. ulcerosa*

gehören. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache der bereits beschriebenen Regionen auf Chromosom 1 mit Hinweisen auf Suszeptibilität für chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Möglicherweise fällt das CD45 Gen in eine von diesen Regionen. Diese Hypothese muss allerdings mit Hilfe informativer Mikrosatellitenanalysen überprüft werden.

Ein ganz anderer Aspekt könnte ebenfalls auf eine Korrelation zwischen der Punktmutation im Exon A des CD45 Gens und der Entwicklung von CED hinweisen. Diese Anhaltspunkte beruhen auf dem Vergleich der Erkrankungsfrequenz beider untersuchten entzündlichen Darmerkrankungen und der Frequenz der Punktmutation in verschiedenen Bevölkerungsgruppen.

In einer Veröffentlichung (Tchilian et al. 2002) konnte die Punktmutation im Exon A des CD45 Gens in einer farbigen afrikanischen Population nicht gefunden werden. Dagegen wurde in der gleichen Arbeit in einer weißen kaukasischen Population eine Häufigkeit von 1,5 % ermittelt. Bei weißen kaukasischen Patienten mit der Erkrankung M. Crohn lag die Häufigkeit bei 0,45 %, in einer Gruppe weißer kaukasischer Patienten mit der Erkrankung C. ulcerosa lag sie bei 3,48 %. Durch andere Erhebungen wurde bekannt (Duerr et al. 1998), dass weiße kaukasische Bevölkerungsmitglieder doppelt so häufig an M. Crohn und sogar viermal so häufig an C. ulcerosa erkranken, als schwarze afrikanische Bevölkerungsmitglieder. Werden diese Daten in Beziehung gesetzt, so könnten sie darauf hinweisen, dass die Mutationsfrequenz möglicherweise mit dem Risiko korreliert, an einer CED wie M. Crohn und insbesondere an C. ulcerosa zu erkranken. Größere Studien mit einer umfangreicheren Anzahl an Patienten aus verschiedenen ethnischen Regionen müssen für die Überprüfung der Hypothese aufgestellt werden, um zu untersuchen, ob von der Punktmutation wirklich ein prädisponierender Charakter für die Erkrankungen ausgeht.

Die Zustandsform, in der die Punktmutation im Exon A des CD45 Gens gefunden wurde, regt zu weiteren Überlegungen an. Alle gefundenen varianten CD45RA Expressionsmuster tragen die Punktmutation an Position 77 im Exon A in heterozygoter Form. Es wurde keine homozygote Variante der Punktmutation identifiziert. Das ist ein auffälliges Resultat dieser Arbeit und es stellt sich die Frage, welche Gründe hierfür verantwortlich sein können.

In der Arbeit wurde für das G Allel mit der Punktmutation eine Allelfrequenz von 1,5 % bei gesunden Blutspendern ermittelt. Andere Studien fanden für kaukasische Bevölkerungsgruppen eine G Allelfrequenz von 0,16 % bis 1,4 % (Tchilian et al. 2001a, Vorechovsky et al. 2001, Wood et al. 2002, Mitterski et al. 2004). Insgesamt ergibt sich damit für die C zu G Transversion an Position 77 von Exon A des CD45 Gens nur eine geringe Frequenz. Aus diesem Grund reicht die Anzahl der untersuchten Personen dieser Arbeit wahrscheinlich nicht aus, um einen homozygoten Merkmalsträger zu finden. Der fehlende Nachweis eines homozygoten Trägers könnte aber auch auf anderen Ursachen beruhen, wenn die folgenden Aspekte betrachtet werden.

Das CD45 Molekülsystem ist an der T-Zellreifung im Thymus beteiligt. Die CD4+/CD8-/CD3- unreifen Lymphozyten exprimieren weder Exon A noch Exon C kodierte Epitope, dafür aber die Isoformen B und 0. Im CD45 Expressionsmuster unterscheiden sich unreife von Lymphozyten reifen medulären CD4+/CD3+ oder CD8+/CD3+ Zellen, die die positive und negative Selektion im Thymus durchlaufen haben. Diese Zellen exprimieren nicht die Isoform 0, wohl aber die Isoform B. Zusätzlich tragen sie dann Isoformen mit Exon A und Exon C kodierten Aminosäurenbereichen auf der Zelloberfläche (Fujii et al. 1992, Zapata et al. 1994). Reife Lymphozyten werden in die Peripherie entlassen und repräsentieren dann naive CD45RA+/CD45R0- T-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt gehabt haben. Möglicherweise ist der Reifungsprozess der Lymphozyten gestört, wenn die Punktmutation im Exon A in homozygoter Form vorliegt. In diesem Falle wären wahrscheinlich alle unreifen corticalen Zellen von vornherein CD45RA+ und CD45R0- , so dass die übliche Korrelation zwischen Differenzierung und CD45 Expressionsmuster ausbleibt und die Zellselektion behindert sein könnte. Dann würden aus dem Prozess der Differenzierung keine reifen T-Zellen hervorgehen. Ein derartiger Organismus wäre auf Grund der fehlenden T-Zellen durch Immundefekte gekennzeichnet und möglicherweise nicht lebensfähig. Diese Hypothese bleibt spekulativ, da in allen bisher publizierten Studien, die teilweise deutlich höhere Probandenzahlen haben als in der vorliegenden Arbeit, kein einziger homozygoter Merkmalsträger für die Punktmutation im Exon A des CD45 Gens beschrieben wurde. Trotzdem wird die Annahme, dass ein homozygoter Merkmalsträger in der Lebensfähigkeit beeinträchtigt ist, durch zwei Publikationen unterstützt. In der ersten

Veröffentlichung (Tchilian et al. 2001b) wird von einer Patientin mit SCID berichtet, die eine homozygote 6 bp Deletion im CD45 Gen trug. Durch diese homozygote Deletion gingen die Aminosäuren Glutamin und Tyrosin an Position 339 und 340 in der Fibronectin III-Domäne des CD45 Moleküls verloren. Phänotypisch resultierte daraus eine reduzierte Expression des CD45 Moleküls auf sämtlichen Leukozyten. Es kam zur Ausprägung einer schwersten Immundefizienz und die Patientin verstarb trotz durchgeführter Knochenmarktransplantation.

In der zweiten Publikation (Kung et al. 2000) wird ein Patient vorgestellt, der auf einem Chromosom im Gen für CD45 eine große Deletion aufwies und auf dem anderen Chromosom in der Donorspleißstelle des Exon 13 im Gen für CD45 eine Punktmutation trug, die zum fehlerhaften Spleißen von Exon 13 führte. Auch bei diesem Patienten konnte keine Expression von CD45 Molekülen auf den Lymphozyten nachgewiesen werden und der Patient litt ebenfalls unter schwerer Immundefizienz. Diese Punkte können als Erklärungsmöglichkeit für den fehlenden Nachweis eines homozygoten Trägers der Punktmutation dienen.

Die als statistisch signifikant ermittelte heterogene Frequenz der Punktmutation im Exon A des CD45 Gens bei Patienten mit M. Crohn bzw. C. ulcerosa könnte positive Auswirkungen für den diagnostischen Bereich der beiden CED haben.

In den meisten Fällen führen klinische, endoskopische und histologische Parameter zur Diagnosestellung und der Unterscheidung zwischen M. Crohn oder C. ulcerosa. Jedoch in etwa 10 % der Fälle gelingt diese Differentialdiagnose nicht. Bei solchen Problempatienten könnte der Nachweis der Punktmutation im Exon A des CD45 Gens als ergänzender wertvoller molekularbiologischer Differenzierungsmarker herangezogen werden. Ist die Mutation nachweisbar, leidet der Patient mit größerer Wahrscheinlichkeit an C. ulcerosa als an M. Crohn. Allerdings ist der diagnostische Wert der Punktmutation im Exon A des CD45 Gens begrenzt, weil die Arbeit gezeigt hat, dass bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten keine derartige Mutation vorliegt. Trotzdem erscheint der Nachweis der Punktmutation in zweifelhaften Fällen angebracht, kann er doch zur Diagnosesicherung für C. ulcerosa und zur Optimierung der Therapieverfahren beitragen.

Sowohl bei M. Crohn als auch bei C. ulcerosa kommt es zu chronisch entzündlichen Veränderungen mit Infiltrationen der Darmmucosa mit Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen. Dabei weist das mucosale Immunsystem eine Vielzahl von strukturellen und funktionellen Besonderheiten auf. Wichtige Effektorstrukturen des mucosalen Immunsystems sind die intraepithelialen Lymphozyten, die T-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen (APZ; dendritische Zellen, Makrophagen) der Peyer'schen Plaques und die T-Zellen und Makrophagen der Lamina propria. Der Gleichgewichtszustand des intestinalen Immunsystems ist bei Patienten mit CED erheblich gestört. Studien konnten bei Patienten mit CED den Verlust der Toleranz von Darmzellen gegenüber bakteriellen Produkten der eigenen Darmflora zeigen (Lesage et al. 2002, Holtmann et al. 2003). Hierdurch könnte es zu einer Aktivierung des intestinalen Immunsystems und einer vermehrten Zytokinproduktion kommen, die sowohl für M. Crohn als auch für C. ulcerosa eine wichtige pathogenetische Bedeutung hat.

Folgender hypothetischer Pathomechanismus wird dabei der Erkrankung M. Crohn zu Grunde gelegt: Mucosale, wahrscheinlich bakterielle Antigene lösen über APZ eine spezifische Immunantwort von CD4+/CD45RO+ T-Zellen aus. Diese Zellen synthetisieren vermehrt TNF, IL-2 und IFN- γ (Monteleone et al. 2002, Wittig und Zeitz 2003). Diese aktivieren Makrophagen, welche dann zahlreiche proinflammatorische Zytokine (IL-6, TNF- α) produzieren. Durch das Überwiegen proinflammatorischer Zytokine kommt es schließlich zur Aktivierung von matrix-degradierenden Enzymen (Matrixmetalloproteinen) und zur Gewebsdestruktion. Die hohe Produktion des Th-1-Zytokins IFN- γ bei M. Crohn ist wahrscheinlich durch die erhöhte Produktion von IL-12 und IL-18 durch Makrophagen und intestinale Epithelzellen bedingt. Insgesamt wird für M. Crohn durch das Zytokinprofil ein Th-1-Reaktionskaskade postuliert (Wittig et al. 2001).

Die Pathogenese bei C. ulcerosa und die Bedeutung von Zytokinen ist im Vergleich zu M. Crohn weniger gut verstanden. Bisher unzureichend charakterisierte Antigene (Autoantigene gegen Epithelzellen oder Becherzellen und bakterielle Antigene) lösen über APZ eine spezifische Immunantwort von CD4+/CD45RO+ T-Zellen aus. Diese sind im Gegensatz zu M. Crohn durch eine erhöhte Produktion des Th-2-Zytokins IL-5 charakterisiert (MacDonald and Monteleone 2005). Außerdem kommt es bei der Erkrankung C. ulcerosa zur Aktivierung von Makrophagen mit der

Produktion von zahlreichen proinflammatorischen Zytokinen (IL-5, IL-6, TNF- α). Durch die Wirkung der proinflammatorischen Zytokine und eventuell im Zusammenspiel mit Autoantikörpern (z.B. ANCA), deren Bedeutung und Spezifität bisher noch unzureichend gesichert ist, kommt es möglicherweise zu Ulcerationen und Gewebsdestruktionen. Insgesamt scheint bei der Erkrankung C. ulcerosa die Th-2-Reaktionskaskade von zentraler Bedeutung zu sein.

Es steht nun zur Diskussion, wie sich die Ergebnisse dieser Arbeit in die dargestellten hypothetischen Pathomechanismen einordnen lassen. Es ist bekannt, dass durch die Punktmutation eine permanente Expression der Isoform AB auf CD45R0+ T-Zellen gefunden wird (Thude 1995). Welche funktionellen Konsequenzen sich daraus für die CD45R0+ T-Zellen ergeben ist aber bisher noch unklar. In der vorliegenden Studie wurde ein vermehrtes Auftreten der Punktmutation bei Patienten mit C. ulcerosa im Vergleich zu Patienten mit M. Crohn gefunden. Denkbar ist, dass sich durch die zusätzlich exprimierte Isoform AB spezifische CD45R0+ T-Zellen entwickeln, die bevorzugt Th-2-Zytokine synthetisieren und somit die Pathophysiologie in Richtung C. ulcerosa lenken. Dieser Anhaltspunkt wird durch ein Mausmodell unterstützt.

Bei einer CD45 knock out Maus wurde eine Interaktion zwischen CD45 Expression und entzündlichen Darmerkrankungen (Lopeza and Holmes 2004) gefunden. Die T-Zellen dieser Maus besitzen ein Th-2-Zytokinprofil und entwickeln unter bestimmten Ernährungsbedingungen eine Colitis (Bouma and Strober 2003). Inwieweit sich diese Ergebnisse aus dem Mausmodell auf den Menschen übertragen lassen, muss noch überprüft werden.

Für die CED bestehen vielfältige therapeutische Optionen. Hierzu zählen unter anderem Azathioprin, Methotrexat, Cyclosporin, biologische Therapeutika (CD4-Antikörper) und alternative Behandlungsmethoden. Etwa 20 % aller Patienten mit CED gelten allerdings als therapierefraktär gegenüber der antiinflammatorischen und immunsuppressiven Therapie.

Innerhalb dieser Arbeit wurde keine Differenzierung zwischen medikamentös gut eingestellten Patienten, therapierefraktären Patienten oder einer Gruppe von Patienten mit Folgekomplikationen getroffen, so dass in der Arbeit unklar bleibt, ob

die Punktmutation im Exon A des CD45 Gens den Therapieerfolg beeinflusst. Diese Fragestellung muss durch nachfolgende Untersuchungen geklärt werden.

Ein Teil der Arbeit befasste sich mit der beschriebenen Mutation im Exon C des CD45 Gens. Es wurde die CD45RC Expression auf Lymphozyten von Patienten mit M. Crohn, C. ulcerosa und gesunden Kontrollpersonen untersucht.

Die Histogramme für die Expression der Lymphozyten von Probanden mit klassischem CD45RA Expressionsmuster zeigten bei der Untersuchung mit dem CD45RC Antikörper eine Unterteilung der Lymphozytenpopulationen in 97 % CD45RC+ und 3 % CD45RC- Lymphozyten. Bei den Probanden mit dem varianten CD45RA Expressionsmuster ergab sich eine Verteilung von 93 % für die CD45RC+ Population vs. 7 % für die CD45RC- Population. Die leicht unterschiedliche prozentuale Verteilung beruht wahrscheinlich auf der differentiellen Anzahl von Probanden mit normalem CD45RA Expressionsmuster (n = 371) im Vergleich zur Anzahl der Probanden mit variantem CD45RA Expressionsmuster (n = 12). Es fanden sich bei diesen Untersuchungen weder im Patientenkollektiv noch in der Kontrollgruppe deutliche Auffälligkeiten im CD45RC Expressionsmuster, die vergleichbar mit dem varianten CD45RA Expressionsmuster wären. Der einheitliche CD45RC Phänotyp lässt die Schlussfolgerung zu, dass es im gesamten untersuchten Kollektiv keine spleißrelevanten phänotypverändernden Mutationen im Exon C des CD45 Gens gibt. Dieses deutet auf ein häufigeres Auftreten von spleißrelevanten Mutationen im Exon A als im Exon C hin.

Es gibt Stellen in der DNA, die durch Mutation viel häufiger betroffen werden als andere. Solche Stellen bezeichnet man als „Hot spots“ der Mutation.

Die Basenabfolge C-G markiert zum Beispiel solch einen Hot spot, wenn Cytosin methyliert ist. Das 5-Methylcytosin kann durch Desaminierung verändert werden: aus 5-Methylcytosin entsteht Thymin. Thymin wird als normaler Baustein der DNA nicht als falsch von den DNA-Glykosylasen des Reparatursystems erkannt. Es bleibt als Ergebnis der Desaminierung zurück und wird bei der nächsten Replikationsrunde fixiert, indem im Gen an der Stelle eines ursprünglichen G-C Basenpaares ein A-T Basenpaar erscheint (Knippers 2001).

Das Basenpaar C-G kommt im Exon A und Exon C des CD45 Gens jeweils zweimal in Regionen vor, die zu den spleißrelevanten Sequenzmotiven gehören. Damit ist unter Berücksichtigung des Hot spots die Wahrscheinlichkeit eines Mutationseignisses für beide Exons gleich groß. Die beobachtete höhere Frequenz von spleißrelevanten Mutationen im Exon A im Vergleich zum Exon C muss deshalb andere Gründe haben.

In anderen Studien ist die CD45RC Expression ebenfalls schwerpunktmäßig untersucht worden. Dabei ergab sich für die kaukasische Bevölkerungsgruppe ein einheitliches Bild. Anders bei der Untersuchung einer asiatischen Population. Hier wurde auf Lymphozyten ein variantes CD45RC Expressionsmuster gefunden, das sich dadurch auszeichnete, dass Exon C kodierte Sequenzen vermindert auftraten, während die Isoform 0 verstärkt exprimiert wurde. Dieses variante CD45RC Expressionsmuster beruht auf einer Punktmutation im Exon C des CD45 Gens an Position 138 mit einem Austausch von A zu G. (Stanton 2003). Diese Punktmutation tritt in der japanischen Bevölkerung mit einem Prozentsatz von 27,3 % auf. Dagegen ist in einer Studie an englischen Probanden diese Punktmutation nur bei 0,4 % der Bevölkerung gefunden worden.

In der vorliegenden Arbeit konnten keine phänotypischen Auffälligkeiten für die CD45RC Expressionsmuster aufgedeckt werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die beschriebene Punktmutation im Exon C des CD45 Gens im Untersuchungskollektiv wahrscheinlich nicht präsent ist. Genotypische Analysen für Exon C des CD45 Gens würden den Beweis für diese Annahme liefern.

Eine andere Studie zu dieser Thematik zeigt eine signifikante Reduzierung der Häufigkeit dieser Punktmutation (A zu G) im Exon C in heterozygoter Form bei Hepatitis B Infektionen und autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen in der asiatischen Bevölkerungsgruppe. Unter Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis kamen keine homozygoten Merkmalsträger vor (Boxall 2004).

Derartige Assoziationen konnten in der vorliegenden Arbeit mit der zur Verfügung stehenden Probandenzahl nicht aufgestellt werden. Da die Mutation nur mit sehr niedriger Frequenz in der kaukasischen Bevölkerung zu finden ist, müssten sehr große Kollektive untersucht werden, um eine Aussage über die Assoziation zu erlauben.

Zusammengefasst können in der Zukunft von den erzielten Ergebnissen der vorliegenden Arbeit neue Impulse für die Differentialdiagnostik von M. Crohn und C. ulcerosa erwartet werden. Die hier gefundene unterschiedliche Häufigkeit der Punktmutation im Exon A des CD45 Gens innerhalb der verglichenen Patientengruppen sollte in weiteren Studien zu einer Klärung hinsichtlich des prädisponierenden Charakters für C. ulcerosa führen. Das könnte ein Mosaikbaustein sein, um die Pathophysiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen M. Crohn und insbesondere C. ulcerosa besser zu verstehen.

8 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass ein variantes CD45RA Expressionsmuster auf T-Zellen bei Patienten mit M. Crohn (n = 111) einmal gefunden wurde, bei Patienten mit C. ulcerosa (n = 72) fünfmal gefunden wurde und in einem Kontrollkollektiv gesunder Probanden (n = 200) sechsmal auftrat.

Das variante CD45RA Expressionsmuster basiert auf einer Punktmutation (C zu G an Position 77 von Exon A des CD45 Gens). Mit Hilfe einer spezifischen PCR-RFLP-Analyse wurde ermittelt, dass bei allen Merkmalsträgern mit dem varianten CD45RA Expressionsmuster die Punktmutation in heterozygoter Form vorlag.

Ein homozygoter Träger wurde nicht entdeckt.

Der fehlende Nachweis eines homozygoten Trägers könnte auf einer zu geringen Anzahl untersuchter Probanden beruhen oder einen Hinweis für die unzureichende Lebensfähigkeit der homozygoten Merkmalsträger geben. Die zweite Alternative beruht auf der Tatsache, dass durch die CD45RA Expression auf Thymozyten die T-Zellreifung im Thymus mitgesteuert wird. Möglicherweise unterbleibt dadurch bei einem homozygoten Träger eine entsprechende T-Zellausreifung, woraus eine unzureichende Immunabwehr resultieren würde.

Aus den PCR-RFLP-Analysen ergab sich für die Punktmutation im Kontrollkollektiv eine Frequenz von 1,5 %, bei Patienten mit M. Crohn eine Frequenz von 0,45 % und bei Patienten mit C. ulcerosa eine Frequenz von 3,48 %. In den zugehörigen statistischen Vergleichen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen untersuchten Erkrankungen zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Dagegen ist der Vergleich beider Erkrankungen miteinander statistisch signifikant ($p = 0,036$). Daraus ist die Schlussfolgerung zu ziehen, dass die Punktmutation an Position 77 (C zu G) im Exon A des CD45 Gens eher prädisponierend für die Erkrankung C. ulcerosa wirkt, als für die Erkrankung M. Crohn.

In bisherigen Publikationen wurde eine Assoziation zwischen der Punktmutation und verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose, Autoimmunhepatitis und Sklerodermie gefunden. Die höhere Frequenz der Punktmutation bei Patienten mit C. ulcerosa deutet darauf hin, dass die Erkrankung den Autoimmunerkrankungen zuzuordnen ist. Die Annahme wird durch die Resultate anderer Untersuchungen unterstützt.

Bei der Erkrankung C. ulcerosa treten T-Zellen mit einem Zytokinmuster vom Th-2-Typ auf, bei M. Crohn wird eher ein Th-1-Typ gefunden.

Bisher ist unbekannt, welche funktionellen Konsequenzen sich aus dem varianten CD45RA Expressionsmuster für die T-Zellen ergeben. Die heterogene Verteilung der Punktmutation bei M. Crohn und C. ulcerosa deutet darauf hin, dass T-Zellen mit variantem CD45RA Expressionsmuster bevorzugt in die Th-2-Richtung ausdifferenzieren und weniger in die Th-1-Richtung.

In 10 % aller Fälle von CED kann nicht zwischen M. Crohn und C. ulcerosa unterschieden werden. In diesen Fällen kann der Nachweis der Punktmutation die Differentialdiagnose verbessern, denn bei Präsenz der Punktmutation ist die Erkrankung C. ulcerosa wahrscheinlicher als M. Crohn. Aus diesem Grund können von der Arbeit positive Impulse für die Sicherung der Diagnose bei M. Crohn und C. ulcerosa erwartet werden.

Zusätzlich zu den Untersuchungen zum CD45RA Expressionsmuster und der verursachenden Punktmutation im Exon A des CD45 Gens wurde das CD45RC Expressionsmuster auf Lymphozyten von Patienten mit M. Crohn, C. ulcerosa und von Kontrollpersonen analysiert. Alle untersuchten Proben zeigten identische CD45RC Expressionsmuster. Daraus kann geschlossen werden, dass sich in der untersuchten Population keine entsprechenden Mutationen ereignet haben, die das alternative Spleißen für Exon C beeinflussen. Spleißrelevante Mutationen scheinen in der kaukasischen Bevölkerung häufiger in Exon A aufzutreten als in Exon C.

9 Literatur- und Quellenverzeichnis

Auer IO. 1991. Immunologie des Gastrointestinaltraktes. In: Gemsa D, Kalden JR, Resch K, Hrsg. Immunologie. Dritte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 380-397.

Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, Fennell J, Smith BRK, MacKinlay E, Morecroft J, Anderson N, Kelleher D, O'Sullivan M, McManus R, Satsangi J. 2004. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity with Europeans? *Genes and Immunity*, 5(5):417-425.

Ballerini C, Rosati E, Salvetti M, Ristori G, Cannoni S, Biagioli T, Massacesi L, Sorbi S, Vergelli M. 2002. Protein tyrosine phosphatase receptor-type C exon 4 gene mutation distribution in an Italian multiple sclerosis population. *Neurosci Lett*, 328(3):325-7.

Barcellos LF, Caillier S, Dragone L, Elder M, Vittinghoff E, Bucher P, Lincoln RR, Pericak-Vance M, Weiss A, Hauser SL, Oksenberg JR. 2001. PTPRC (CD45) is not associated with the development of multiple sclerosis in U.S. patients. *Nat Genet*, 29(1):23-24.

Bayless TM, Tokayer AZ, Polito JM, Quaskey SA, Mellits ED, Harris ML. 1996. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members-potential hereditary influences. *Gastroenterology*, 111(3):573-9.

Beiche A, König H.-H, Ebinger M, Matysiak-Klose D, Braun V, Leidl R. 2003. Kosten der allgemeinmedizinischen Versorgung von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. *Z Gastroenterol*, 06/03:527-536.

Bosseckert H, Günther E. 1980. Der Morbus Crohn - Beobachtungen am eigenen Krankengut. *Z Ges Inn Med*, 33:73-78.

Bouma G, Oudkerk PM, Crusius JB, Schreuder GM, Hellemans HP, Meijer BU, Kostense PJ, Giphart MJ, Meuwissen SG, Pena AS. 1997. Evidence for genetic heterogeneity in inflammatory bowel disease (IBD): HLA genes in the predisposition to suffer from ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). *Clin Exp Immunol*, 109(1):175-9.

Bouma G, Strober W. 2003. The immunological and Genetic Basis of Inflammatory Bowel Disease. *Nat Rev Immunol*, 3(7):521-33.

Boxall S, Stanton T, Hirai K, Ward V, Yasui T, Tahara H, Tamori A, Nishiguchi S, Shiomi S, Ishiko O, Inaba M, Nishizawa Y, Dawes R, Bodmer W, Beverley PC, Tchilian EZ. 2004. Disease associations and altered immune function in CD45 138G variant carriers. *Hum Mol Genet*, 13(20):2377-84.

Braun C, Zahn R, Martin K, Albert E, Folwaczny C. **2001**. Polymorphism of the ICAM-1 gene are associated with inflammatory bowel disease, regardless of the p-ANCA status. *Clin Immunol*, 101(3):357-360.

Cavanaugh JA, Adams KE, Quak EJ, Bryce ME, O'Callaghan NJ, Rodgers HJ, Magarry GR, Butler WJ, Eaden JA, Roberts-Thomson IC, Pavli P, Wilson SR, Callen DF. **2003**. CARD15/NOD2 risk alleles in the development of Crohn's disease in the Australian population. *Am J Hum Genet*, 67(Pt 1):35-41.

Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, Pickles MR, Qin L, Fu Y, Mann JS, Kirschner BS, Jabs EW, Weber J, Hanauer SB, Bayless TM, Brant SR. **1998**. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: Evidence for epistasis between 1p and IBD 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(13):7502-07.

Clement LT. **1992**. Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation. *J Clin Immunol*, 12(1):1-10.

Cope GF, Heatley RV, Kellerher JK. **1986**. Smoking and colonic mucus in ulcerative colitis. *BMJ (Clin Res Ed)*, 293(6545):481.

Curran ME, Lau KF, Hampe J, Schreiber S, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Stokkers P, van Deventer SJ, Mirza M, Raedler A, Kruis W, Meckler U, Theuer D, Herrmann T, Gionchetti P, Lee J, Mathew CG, Lennard-Jones J. **1998**. Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. *Gastroenterology*, 115(5):1066-1071.

Desai DM, Sap J, Schlessinger J, Weiss A. **1993**. Ligand-Mediated Negative Regulation of a Chimeric Transmembrane Receptor Tyrosine Phosphatase. *Cell*, 73(3):541-54.

Dignass A, Goebell H. **1998**. Fortschritte in der Ätiologie- und Pathogeneseforschung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. *Internist*, 39(10):1004-1012.

Donovan JA, Koretzky GA. **1993**. CD45 and the immune response. *J Am Soc Nephrol*, 4(4):976-85.

Dornan S, Sebestyen Z, Gamble J, Nagy P, Bodnar A, Alldridge L, Doe S, Holmes N, Goff LK, Beverley P, Szollosi J, Alexander DR. **2002**. Differential association of CD45 isoforms with CD4 and CD8 regulates the actions of specific pools of p56lck tyrosine kinase T cell antigen receptor signal transduction. *J Biol Chem*, 277(3):1912-1918.

Duchmann R, Neurath MF, Meyer zum Buschfelde KH. **1997**. Responses to self and non-self intestinal microflora in health and inflammatory bowel disease. *Res Immunol*, 148(8-9):589-94.

Duchmann R, Hoffmann J, Marth T, Schneider T, Stallmach A, Zeitz M. **1999**. Mukosales Immunsystem im Darm - Immunologische Grundlagen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen und der HIV-induzierten Enteropathie. Mag. Forschung, 1/1999.

Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Davis S, Preston RA, Chensny LJ, Brown JL, Ehrlich GD, Weeks DE, Aston CE. **1998**. Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on chromosome 12. Am J Hum Genet, 63(1):95-100.

Duerr RH. **2003**. Update of the genetics of inflammatory bowel disease. Clin Gastroenterol, 37(5):358-67.

Emmrich J. **2002**. [Vortrag]. Leukozytapherese / Cellsorption bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Berlin: Symposiumsband.

Fernandez-Luna JL, Matthews J, Brownstein BH, Schreiber RD, Thomas ML. **1991**. Characterization and Expression of the Human Leukocyte-Common Antigen (CD45) Gene Contained in Yeast Artificial Chromosomes. Genomics, 10(3):756-64.

Feuerbach S, Schölmerich J. **2000**. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Radiologe, 40(3):324-338.

Fiocchi C. **1998**. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. Gastroenterology, 115(1):182-205.

Fiocchi C. **2005**. Inflammatory bowel disease pathogenesis: therapeutic implications. Chinese Journal of Digestive Diseases, 6(1):6-9.

Folwaczny C, Glas J, Torok HP. **2003**. Crohn's disease: an immunodeficiency? Eur J Gastroenterol Hepatol, 15(6):621-6.

Fujii Y, Okumura M, Inada K, Nakahara K, Matusda H. **1992**. CD45 isoform expression during T cell development in the thymus. Eur J Immunol, 22(7):1843-50.

Hall LR, Streuli M, Schlossman SF, Saito H. **1988**. Complete exon-intron organization of the human leukocyte common antigen (CD45) gene. J Immunol, 141(8):2781-87.

Hampe J, Shaw SH, Saiz R, Leysens N, Lantermann A, Mascheretti S, Lynch NJ, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Stokkers P, Morin P, Mirza MM, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME, Schreiber S. **1999**. Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. Am J Hum Gen, 65(6):1647-55.

Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher I, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. **2001**. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. Lancet, 357(9272):1925-8.

Herbert TB, Cohen S. **1993**. Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. *Psychosom Med*, 55(4):364-379.

Herrlinger K, Stange EF. **2000**. Azathioprin bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: Die Evidenzbasis. *Med Klin*, 95:201-206.

Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Colombel JF, Lesage S, Thomas G. **1996**. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosom 16. *Nature*, 379(6568):821-823.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cartot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. **2001**. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411(6837):599-603.

Holtmann M, Wanitschke R, Helisch A, Bartenstein P, Galle PR, Neurath M. **2003**. Anti-TNF-Antikörper zur Therapie von entzündlichen Darmstenosen bei Morbus Crohn. *Z Gastroenterol*, 1/2003.

Irie-Sasaki J, Sasaki T, Penninger JM. **2003**. CD45 regulated signaling pathways. *Curr Top Med Chem*, 3(7):783-96.

Isakov N. **1993**. Tyrosine phosphorylation and dephosphorylation in T lymphocyte activation. *Mol Immunol*, 30(2):197-210.

Jacobsen M, Schweer D, Ziegler A, Gaber R, Schock S, Schwinzer R, Wonigeit K, Lindert R, Kantarci O, Schäfer-Klein J, Schipper HI, Oertel WH, Heidenreich F, Weinshenker BG, Sommer N, Hemmer B. **2000**. A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis. *Nat Genetics*, 26(4):495-9.

Karban A, Waterman M, Panhuysen CI, Pollak RD, Neshier S, Datta L, Weiss B, Suissa A, Shamir R, Brant Saurer Regen, Eliakim R. **2004**. NOD2/CARD 15 genotype and phenotype differences between Ashkenazi and Sephardic Jews with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 99(6):1134-40.

Klein W, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, Eitner K, Marx M, Duering N, Epplen JT. **2002**. A polymorphism in the CD14 gene is associated with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol*, 37(2):189-91.

Klein W, Tromm A, Griga T, Folwaczny C, Hocke M, Eitner K, Marx M, Duering N, Epplen JT. **2003**. Interaction of polymorphism in the CARD15 and CD14 genes in patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol*, 38(8):834-6.

Klein W, Tromm A, Folwaczny C, Hagedorn M, Duering N, Epplen JT, Schmiegel WH, Griega T. **2004**. A polymorphism of the NKFBIA gene is associated with Crohn's disease patients lacking a predisposing allele of the CARD15 gene. *Int J Colorectal Dis*, 19(2):153-156

Knippers R. 2001. Molekulare Genetik. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Koretzky GA, Picus J, Thomas ML, Weiss A. **1990.** Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway. *Nature*, 346(6279):66-8.

Koretzky GA. 1993. Role of CD45 tyrosine phosphatase in signal transduction in the immune system. *FASEB J*, 7(5):420-6.

Kung C, Pingel JT, Heikinheimo M, Klemola T, Varkila K, Yoo LI, Vuopala K, Poyhonen M, Uhari M, Rogers M, Speck SH, Chatila T, Thomas M. **2000.** Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nat Med*, 6(3) 343-345.

Lehmann FS. 2003. Pathophysiologie der chronisch entzündlichen Darmkrankheiten. *Therapeutische Umschau*, 60(3):127-132.

Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP; EPWG-IBD Group; EPIMAD Group; GETAID Group. **2002.** CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*, 70(4):845-857.

Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Andreoli A, Luzi C, Arca M, Berto E, Milite G, Marcheggiano A. **2000.** Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol*, 95(5):1213-20.

Lopeza MC, Holmes N. **2004.** CD45 knockout mice, diet and colitis: in the absence of CD45 colitis follows dietary changes. *Ann N Y Acad. Sci*, 1029:355-357.

Lorenzen R. 2002. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Die gelben Hefte*, 42:136-143.

Low JH, Williams FA, Yang X, Cullen S, Colley J, Ling KL, Armuzzi A, Ahmad T, Neville MU, Dechairo BM, Walton R, Lench NJ, Jewell DP. **2004.** Inflammatory bowel disease is linked to 19p13 and associated with ICAM-1. *Inflamm Bowel Dis*, 10(3):173-181.

MacDonald TT, Monteleone G. **2005.** Immunity, Inflammation and Allergy in the Gut: Review. *Science*, 307(5717):1920 ff.

Mathew CG, Lewis CM. **2004.** Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Hum Mol Genet*. 13 Spec No 1:R161-8.

McFarland ED, Hurley TR, Pingel JT, Sefton BM, Shaw A, Thomas ML. **1993.** Correlation between Src family member regulation by the protein-tyrosine-phosphatase CD45 and transmembrane signaling through the T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci*, 90(4):1402-03.

Miterski B, Sindern E, Haupts M, Schimrigk S, Epplen JT. **2002**. PTPRC (CD45) is not associated with multiple sclerosis in a large cohort of German patients. *BMC Med Genet*, 3(1):3

Miterski B, Drynda S, Böschow G, Klein W, Oppermann J, Kekow J, Epplen JT. **2004**. Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis. *BMC Genetics*, 5-19.

Monteleone I, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G, Pallone F. **2002**. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* 50(3):III60-64.

Neidhart M, Pataki F, Michel BA, Fehr K. **1996**. CD45 isoforms expression on CD4+ and CD8+ peripheral blood T-lymphocytes is related to auto-immune processes and hematological manifestations in systemic lupus erythematosus. *Schweiz Med Wochenschr*, 126(45):1922-25.

Neurath MF, Schürmann G. **2000**. Zur Immunpathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. *Chirurg*, 71(1):30-40.

Newman B, Siminovitch KA. **2005**. Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 21(4):401-407.

Newman B, Gu X, Wintle RF. **2005**. A risk haplotype in the solute carrier family 22A4/22A5 gene cluster influences phenotypic expression of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 128(2):260-269.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. **2001**. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411(6837):603-606.

Orchard TR, Satsangi J, van Heel D, Jewell DP. **2000**. Genetics of inflammatory bowel disease: a reappraisal. *Scan J Immunol*, 51(1):10-17.

Parkes M, Barmada MN, Satsangi J, Weeks DE, Jewell DP, Duerr RH. **2000**. The IBD2 locus shows linkage heterogeneity between ulcerative colitis and Crohn disease. *Am J Hum Genet*, 67(6):1605-1610.

Penninger JM, Irie-Sasaki J, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos AJ. **2001**. CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nature Immunology*, 2(5):389-396.

Pelteкова VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA. **2004**. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn's Disease. *Nat Genet*, 36(5):471-475.

Pierik M, Yang H, Barmada MM, Cavanaugh JA, Annese V, Brant SR, Cho JH, Duerr RH, Hugot JP, McGovern DP, Paavola-Sakki P, Radford-Smith GL, Pavli P, Silverberg MS, Schreiber S, Taylor KD, Vlietnick R; IBD International Genetics Consortium. **2005**. The IBD international genetics consortium provides further evidence for linkage to IBD4 and shows gene-environment interaction. *Inflamm Bowel Dis*, 11(1):1-7.

Pingel JT, Thomas ML. **1989**. Evidence That the Leukocyte-Common Antigen is Required for Antigen-Induced T Lymphocyte Proliferation. *Cell*, 58(6):1055-65.

Podolsky DK. **1991**. Inflammatory bowel disease I+II. *N Engl J Med* 325(13):928-937; 325(14):1008-16.

Podolsky DK. **2002**. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med*, 347(6):417-429.

Powrie F, Mauze S, Coffman RL. **1997**. CD4+ T-cells in the regulation of inflammatory responses in the intestine. *Res Immunol*, 148(8-9):576-581.

Raedler A, Schreiber, S. **1992**. Ist die Colitis ulcerosa eine Autoimmunerkrankung? *Med Wochenschr*, 117(35):1333-1338.

Ralph SJ, Thomas ML, Morton CC, Trowbridge IS. **1987**. Structural variants of human T200 glycoprotein (leukocyte-common antigen). *EMBO Jour*, 6 :1251-57.

Rotter JI. **1994**. Inflammatory bowel disease. *Lancet*, 343(8909):1360.

Sandborn WJ, Loftus EV, Colombel JF, Fleming KA, Seibold F, Homburger HA, Sendid B, Chapman RW, Tremaine WJ, Kaul DK, Wallace J, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Targan SR. **2001**. Evaluation of serologic disease markers in a population-based cohort of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 7(3):192-201.

Sandborn WJ. **2004**. Serologic markers in inflammatory bowel disease: state of the art. *Rev Gastroenterol Disord*, 4(4):167-174.

Sandborn WJ. **2006**. Preliminary data on the use of apheresis in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 12(1):15-21.

Sartor RB. **1997**. The influence of normal microbial flora on the development of chronic mucosal inflammation. *Res Immunol*, 148(8-9):567-76.

Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C, Farrant JM, Bell JI, Jewell DP. **1996a**. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet*, 347(9010):1212-1217.

Satsangi J, Parkers M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. **1996b**. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease: evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet*, 14(2):199-202.

Schmiegel W, Adler G, Fruhmorgen P, Folsch U, Graeven U, Layer P, Petrasch S, Porschen R, Pox C, Sauerbruch T, Schmoll HJ, Zeitz M. **2000**. Kolorektale Karzinome: Prävention und Früherkennung in der asymptomatischen Bevölkerung. *Z Gastroenterol*, 38(1):49-75.

Schwinzer R, Wonigeit K. **1990**. Genetically determined lack of CD45R-T-cells in healthy individuals. Evidence for a regulatory polymorphism of CD45 antigen expression. *J Exp Med*, 175(5):1803-08.

Schwinzer R, Witte T, Hundrieser J, Ehlers S, Momot T, Hunzelmann N, Krieg T, Schmidt RE, Wonigeit K. **2003**. Enhanced frequency of a PTPRC (CD45) exon A mutation (77 C→G) in systemic sclerosis. *Genes Immun*, 4(2):168-169.

Scott CS, Richards SJ, Cole JC, Gooi HC. **1991**. Variant CD45R expression with autosomal dominant inheritance affects both helper/inducer (CD4+) and suppressor/cytotoxic (CD8+) T cell populations. *Clin Exp Immunol*, 86(3):500-5.

Seibold F, Scheurlen M, Müller A, Jenss H, Weber P. **1996**. Impaired pancreatic function in patients with Crohn's disease with and without pancreatic autoantibodies. *J Clin Gastroenterol*, 22(3):202-6.

Seibold F, Egger B, Göke B. **2000**. Neues von der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: Was haben wir vom Kolitis-Tiermodell gelernt? *Schweiz Med Wochenschr*, 130(20):749-55.

Stange EF, Schreiber S, Fölsch UR, Herbay vA, Schölmerich J, Hoffmann J, Zeitz M, Fleig WE, Buhr HJ, Kroesen AJ, Moser G, Matthes H, Adler G, Reinshagen M, Stein J. **2003**. Neue Leitlinien der DGVS zur Therapie des Morbus Crohn. *Z Gastroenterol*, 41(1):19-61.

Stanton T, Boxall S, Hirai K, Dawes R, Tonks S, Yasui T, Kanaoka Y, Yuldasheva N, Ishiko O, Bodmer W, Beverley P, Tchilian EZ. **2003**. A high-frequency polymorphism in exon 6 of the CD45 tyrosine phosphatase gene (PTPRC) resulting in altered isoform expression. *PNAS*, 100(10):5997-6002.

Stein J, Dignass A. **2001**. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Gastroenterologie Update*, Springer- Verlag.

Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ. **1999**. HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut*, 45(3):395-401.

Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, Rosenstiel P, Albrecht M, Croucher PJ, Seegert D, Nikolaus S, Hampe J, Lengauer T, Pierrou S, Foelsch UR, Mathew CG, Lagerstrom-Fermer M, Schreiber S. **2004**. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet*, 36(5):476-480.

Streuli M, Hall LR, Saga Y, Schlossmann SF, Saito H. **1987**. Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigen. *J Exp Med*, 166(5):1548-66.

Suzuki A, Sugimura K, Ohtsuka K, Hasegawa K, Suzuki K, Ishizuka K, Mochizuki T, Honma T, Narisawa R, Asakura H. **2000**. Fas/Fas ligand expression and characteristics of primed CD45R0+ T cells in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*, 35(12):1278-83.

Tchilian EZ, Wallace DL, Imami N, Liao HX, Burton C, Gotch F, Martinson J, Haynes BF, Beverley P. **2001a**. The exon A (C77G) mutation is a common cause of abnormal CD45 splicing in humans. *J Immunology*, 166(10):6144-6148.

Tchilian EZ, Wallace DL, Wells RS, Flower DR, Morgan G, Beverley P. **2001b**. A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID. *J Immunol*, 166(2):1308-1313.

Tchilian EZ, Dawes R, Ramaley PA, Whitworth JA, Yuldasheva N, Wells RS, Watera C, French N, Gilks CF, Kunachiwa W, Ruzibakiev R, Leetrakool N, Carrington C, Ramdath DD, Gotch F, Stephens HA, Hill AV, Beverley PC. **2002**. A CD45 polymorphism associated with abnormal splicing is absent in African populations. *Immunogenetics*, 53(10-11):980-983.

Thude H, Hundrieser J, Wonigeit K, Schwinzer R. **1995**. A point mutation in the human CD45 gene associated with defective splicing of exon A. *Eur J Immunol*, 25(7):2101-6.

Thude H. **1996**. Untersuchungen zur CD45 Molekülfamilie des Menschen. Expressionsanalysen von Exon C kodierten Epitopen und Nachweis einer Punktmutation in Exon A bei Individuen mit atypischer CD45RA Expression. [Dissertation]. Hannover: Universität Hannover.

Thude H, Rosenhahn S, Hunger-Dathe W, Müller UA, Barz D. **2004**. A transmembrane protein-tyrosine phosphatase receptor type C (CD45) Exon A point mutation (77 C to G) is not associated with the development of type 1 diabetes mellitus in a German population. *Eur J Immunogenet*, 31(6):245-7.

Thude H, Gerlach K, Richartz B, Krack A, Brenke B, Pethig K, Figulla HR, Barz D. **2005**. No association between transmembrane protein-tyrosine Phosphatase receptor type C (CD45) exon A point mutation (77C>G) and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Hum Immunol*, 66(9):1008-1012.

Trowbridge IS, Thomas ML. **1994**. CD45: an emerging role as protein tyrosin phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol*, 12:85-116.

Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB. **1988**. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell*, 55(2):301-308.

Vermeire S, Wild G, Kocher K, Cousineau J, Dufresne L, Bitton A, Langelier D, Pare P, Lapointe G, Cohen A, Daly MJ, Rioux JD. **2002**. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet*, 71(1):74-83.

Vermeire S, Rutgeerts P, van Steen K, Joossens S, Claessens G, Pierik M, Peeters M, Vlietnick R. **2004**. Genom wide scan in a Flemish inflammatory bowel disease population: support for the IBD4 locus, population heterogeneity, and epistasis. *Gut*, 53(7):980-986.

Vogel A, Strassburg CP, Manns MP. **2003**. 77C/G mutation in the tyrosine phosphatase CD45 gene and autoimmune hepatitis: evidence for a genetic link. *Genes and Immunity*, 4(1):79-81.

Vorechovsky I, Kralovicova J, Tchilian E, Maserman T, Zhang Z, Ferry B, Misbah S, Chapel H, Webster D, Hellgren D, Anvret M, Hillert J, Hammarstrom L, Beverley PC. **2001**. Does 77 C→G in PTPRC modify autoimmune disorders linked to the major histocompatibility locus? *Nat Genet*, 29(1):22-23.

Weaver CT, Pingel JT, Nelson JO, Thomas ML. **1991**. CD8+ T-cell clones deficient in the expression of the CD45 protein tyrosine Phosphatase have impaired responses to T-cell receptor stimuli. *Mol Biol Cell*, 11(9):4415-22.

Wittig BM, Duchmann R, Stallmach A, Zeitz M. **2001**. Modulation von Zytokinen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. *Internist*, 42(1):47-54.

Wittig BM, Zeitz M. **2003**. The gut as an organ of immunology. *Int J Colorectal Dis*, 18(3):181-187.

Wood JP, Bieda K, Segni M, Herwig J, Krause M, Usadel KH, Badenhoop K. **2002**. CD45 exon 4 point mutation does not confer susceptibility to type 1 diabetes mellitus or Graves' disease. *Eur J Immunogenet*, 29(1):73-74.

Yang H. **1997**. Analysis of ICAM-1 gene polymorphism in immunologic subsets of inflammatory bowel disease. *Exp Clin Immunogenet*, 14(3):214-225.

Yang H, Rotter JI. **2000**. The genetic background of inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology*, 47(31):5-14.

Zapata JM, Pulido R, Acevedo A, Sanches-Madrid F, DeLandazuri MO. **1994**. Human CD45RC specificity. A novel marker for T cells at different maturation and activation stages. *J Immunol*, 152(8):3852-61.

Zilch CF, Walker AM, Timon M, Goff LK, Wallace DL, Beverley PC. **1998**. A point mutation within CD45 exon A is the cause of variant CD45RA splicing in humans. *Eur J Immunol*, 28(1):22-29.

10 Anhang

10.1 Votum der Ethikkommission

ETHIK-KOMMISSION DER FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA an der Medizinischen Fakultät	
<p>Frau Prof. Dr. D. Barz Institut für Transfusionsmedizin 07740 Jena</p>	<div><div>POSTEINGANG Klinikum der FSU Jena Institut f. Transfusionsmedizin 13. Mai 2003 Nr. 16/03</div><div>09.05.03</div></div>
<p>Bearbeitungs-Nr.: 1116-04/03</p>	
<p>Sehr verehrte Frau Kollegin,</p> <p>in ihrer Sitzung am 08.05.03 hat die Ethik-Kommission der Friedrich-Schiller Universität Ihren Antrag:</p> <p><i>CD45 Expressionsstudie bei Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa</i></p> <p>beraten und erhebt aus ethischer Sicht keine Bedenken.</p> <p>Wir wünschen Ihnen viel Erfolg!</p> <p>Mit kollegialem Gruß</p> <p> Prof. Dr. med. A. Hoffmann Vorsitzende der Ethik-Kommission</p>	
<p><small>Geschäftsstelle der Ethik-Kommission Dornburger Str. 159 07740 Jena Fon: 03641-93 77 50 Fax: 03641-93 77 46 Leiterin der Geschäftsstelle: Dr. U. Skorsetz Mitglieder: Ärzte: Prof. Dr. A. Hoffmann, Prof. Dr. D. Barz, Prof. Dr. G. Klinger, Dr. A. Machnik, OA Dr. H. Sayer; Jurist: Prof. Dr. E. Eichenhofer; Medizintechniker: Prof. Dr. E. Hansen; Ethiker: Prof. Dr. N. Knoepfler; Pfleger: M. Gerns</small></p>	

10.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Transfusionsmedizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena angefertigt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. D. Barz, Direktorin des Institutes für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Jena, für die Möglichkeit, im Institut und insbesondere im entsprechenden Labor zu arbeiten sowie für die hilfreiche Unterstützung und die wertvollen Anregungen bei der Erstellung der Arbeit.

Insbesondere danke ich Herrn Dr. rer. nat. H. Thude, wissenschaftlicher Mitarbeiter im HLA-Labor am Institut für Transfusionsmedizin, für die intensive theoretische und experimentelle Betreuung und für die Einführung in die praktischen Tätigkeiten der Labormethoden. Er stand mir bei der Erstellung der Arbeit in unschätzbare Art und Weise zur Seite.

Den Mitarbeiterinnen des HLA-Labors am Institut für Transfusionsmedizin danke ich für die freundliche Hilfe und Unterstützung in praktischen Fragen.

Bei Herrn PD Dr. med. K. Eitner und den Mitarbeitern der Klinik für Innere Medizin II der Universitätsklinik Jena möchte ich mich für die Unterstützung bei der Selektion der Patienten bedanken.

Großer Dank gilt auch meinem Kollegen- und Freundeskreis, der durch seine Motivation nicht unerheblich zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein Mann Frank ermutigte mich und unterstützte mich mit sehr viel Liebe und Entgegenkommen. Ebenso brachte meine Tochter Anett viel Verständnis auf. Ohne die Hilfe beider hätte ich diese Arbeit nicht zu Ende bringen können. Dafür mein herzlichster Dank.

Kathrin Rebstock

10.3 Lebenslauf

Name, Vorname: Rebstock, Kathrin Johanna

Geburtsname: Schlebe

Geburtsdatum: 11. Juni 1965

Geburtsort: Erfurt

Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Schul Ausbildung: 1972-1980 Allgemeinbildende polytechnische Oberschule Rudolstadt
1980-1983 Erweiterte Oberschule Rudolstadt (Abiturstufe)
1983-1984 Martin-Luther-Universität Halle, Arbeiter- und Bauernfakultät, Institut zur Vorbereitung auf das Auslandsstudium (Reifeprüfung)

Studium: 1984-1990 Studium der Humanmedizin am 2. Medizinischen Institut Moskau, UdSSR

Akademischer Titel: Diplommediziner

Berufsausbildung: 1990-1992 Thüringenklinik Saalfeld, Arzt im Praktikum
1992-1997 Assistenzarzt, Ausbildung zum Facharzt für Anästhesiologie seit 1997 Facharzt für Anästhesiologie in der Thüringen-Klinik Saalfeld-Rudolstadt
2001-2004 Delegierung an das Universitätsklinikum Jena, Institut für Transfusionsmedizin, zur Ausbildung zum Facharzt für Transfusionsmedizin
seit 2004 Facharzt für Transfusionsmedizin in der Thüringen-Klinik Saalfeld-Rudolstadt mit Berufung zum Transfusionsverantwortlichen der Kliniken

Weiterbildungen / Qualifikationen: 1992 Approbation als Ärztin
1993 Fachkunde Rettungsdienst
1997 Fachkunde Strahlenschutz
1997 Facharztanerkennung Anästhesiologie
2001 Fachkunde Laboruntersuchungen der Anästhesie
2004 Facharztanerkennung Transfusionsmedizin

10.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:
Prof. Dr. med. D. Barz, Direktorin des Institutes für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Jena
Dr. rer. nat. H. Thude, wissenschaftlicher Mitarbeiter des HLA-Labors des Institutes für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Jena
Frau Dr. Brandstädt, Mitarbeiterin des Institutes für Medizinische Statistik Jena
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 23. März 2006

Kathrin Rebstock, Verfasserin